



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**CONTAMINAÇÃO MICROBIANA DAS CERDAS DAS ESCOVAS
DENTÁRIAS E A SUA DESINFECÇÃO**

Trabalho submetido por
Alix Julia Young
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

outubro de 2016



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

CONTAMINAÇÃO MICROBIANA DAS CERDAS DE ESCOVAS DENTÁRIAS E A SUA DESINFEÇÃO

Trabalho submetido por
Alix Julia Young
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Maria Helena de Sousa Barroso

e coorientado por
Joana Patrícia Serrano Carvalho

outubro de 2016

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus *pais* que o destino os levou,
mas sei que me guiam de longe,
e que os guardo por perto.

“Perseverance is not a long race; it is many short races one after another.”

- Walter Elliot

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação é o culminar de uma etapa onde pude contar com os contributos de várias pessoas, às quais quero expressar os meus sinceros agradecimentos.

À minha orientadora, Prof. Doutora Helena Barroso, pela disponibilidade desde da primeira abordagem. Estou muito grata pela oportunidade que me concedeu, e pelo apoio, pela orientação e carinho ao longo deste trabalho, que foi sem dúvida enriquecedor e imprescindível.

À Prof. Joana Carvalho, pela coorientação, paciência e tempo. E em especial pelo seu contributo e profissionalismo na elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Doutor Luís Proença, pelo seu tempo e auxílio na execução dos resultados.

Ao Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, seu corpo docente e funcionários por fazerem parte deste percurso. E por me desafiarem a tentar sempre o meu melhor.

Um obrigado de coração cheio, aos meus pais **João, Cláudia e Claire**, por todo o amor e dedicação. E por serem exemplos e pilares na minha vida. Um simples obrigado nunca irá chegar. Devo-lhes tudo o que sou hoje e tudo o que tenho. Aos meus irmãos, pelo companheirismo, carinho e saudade que deixam sempre no meu coração.

À Irina, à minha *crew*, aos *skylovers*, ao Rui, Rita, Gustavo, Rodas Rute D. e colegas de faculdade e de casa o meu profundo agradecimento pela amizade e as memórias.

Um especial agradecimento a minha parceira, Ângela Marques, pela paciência e carinho. pela inspiração de pessoa que é e que me incentiva a tornar numa melhor profissional e ser humano. A sorte existe, obrigada. Agradeço também as “macacas” Daniela Gomes e Sara Pereira, pela amizade genuína que construímos ao longo deste percurso. Pela companhia nas noitadas de estudos sem fim, palavras de apoio nos dias mais difíceis e partilhas de risos que alegrar sempre os meus dias. Que nos espere muitos jeronymos, bingos, filmes de terror e comida mexicana!

E por último, mas não menos importante, ao meu “companheiro”. Por ser o meu melhor amigo e namorado. Por acalmar as minhas dúvidas constantes na vida e acreditar nas minhas capacidades, mesmo quando nem eu acredito. Se todas as pessoas tivessem um “David” ao seu lado, até o céu deixaria de ser o limite.

RESUMO

Objetivos: Com este estudo pretendeu-se mostrar que as cerdas das escovas dentárias retêm vários microrganismos e estabelecer um protocolo de desinfecção, através da sua submersão em colutórios orais, de forma a reduzir a sua carga microbiana. Paralelamente, procurou-se também avaliar o conhecimento de alunos de Medicina Dentária sobre os métodos de desinfecção das escovas dentárias.

Materiais e Métodos: Este estudo foi dividido em três fases. Na 1ª fase os sujeitos responderam a um questionário sobre os hábitos de saúde oral e cuidados com as escovas dentárias. Na 2ª fase foram testados colutórios orais contra *C. albicans*, *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus* e *S. mutans* previamente inoculados em escovas. O antisséptico com melhores resultados foi utilizado no protocolo de desinfecção. Na 3ª fase foram distribuídas escovas, e recolhidas após 3 semanas e analisadas em laboratório, antes (n=47) e depois (n=16) de aplicar o protocolo de higienização. O protocolo de desinfecção consistiu em submergir as cerdas das escovas dentárias em 20 ml de colutório oral durante 5 minutos. Foram feitas as contagens de ufc/escova. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente através do programa SPSS.

Resultados: Todas as escovas apresentaram contaminação microbiana, com prevalência de *Enterobacteriaceae* (84,4%) e *Streptococcus* orais (70,2%). A aplicação do protocolo de desinfecção diminuiu as contagens de ufc/escova nas escovas dentárias, com uma diferença estatística significativa ($p < 0,001$). Os indivíduos demonstraram falta de conhecimento sobre desinfecção de escovas dentárias.

Conclusão: As cerdas das escovas dentárias são reservatórios microbianos. A sua submersão com o colutório Listerine® provou ser um método eficiente para a desinfecção das escovas dentárias. Os restantes colutórios em estudo, demonstraram eficácia, embora mais reduzida, contra os microrganismos testados. A maioria dos indivíduos não possuía conhecimentos sobre desinfecção de escovas dentárias, o que reforça a ideia da falta de divulgação deste tema.

Palavras chave: Colutórios; Contaminação microbiana; Desinfecção; Escovas dentárias;

ABSTRACT

Purpose: The purpose of this study was to show that toothbrushes harbour various microorganisms and to establish a disinfection protocol to lower their bioburden, submersing them in mouthwashes. Further, the awareness about toothbrush disinfection methods was evaluated among the students of Dentistry.

Methods: This study was divided into three phases. In the 1st phase, participants respond to a questionnaire about their oral health habits and care of the dental brushes. In phase 2 mouthwashes were tested against *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*, previously inoculated on toothbrushes. The antiseptic with the best results would be used in the disinfection protocol. In 3rd phase toothbrushes were distributed, and recovered after a three-week use, and analysed without (n=47) and with (n=16) the disinfection protocol. The protocol consisted in immersing toothbrushes in 20ml of a mouthwash for five-minutes. All cfu by toothbrush were counted. Results were analysed statistically with SPSS programme.

Results: All toothbrushes were microbiologically contaminated, with a prevalence of *Enterobacteriaceae* (84.4%) and oral *Streptococcus* (70.2%). The implementation of the protocol reduced cfu counts on all toothbrushes, with a significance difference (p<0.001). The subjects displayed a poor knowledge referring their toothbrush disinfection methods.

Conclusion: Toothbrushes bristles harbour microorganisms. Their immersion in Listerine® proved to be an efficient method for toothbrush disinfection. The rest of the mouthwashes also prove effective, although with lower results, against the microorganism tested. Most of the students had no knowledge about toothbrush disinfection methods, which supports the idea of a lack of available information on this subject.

Key-words: Mouthwash; Microbial contamination; Disinfection; Toothbrush

ÍNDICE GERAL

1.	INTRODUÇÃO.....	13
1.1.-	MICROBIOTA ORAL	13
1.1.1.-	Streptococcus spp.	15
1.1.2.-	Staphylococcus spp.....	16
1.1.3.-	Enterococcus spp.	16
1.1.4.-	Enterobacteriaceae	17
1.1.5.-	Candida spp.	18
1.2.-	BIOFILME DENTÁRIO	20
1.3.-	ESTRATÉGIAS PARA A HIGIENE ORAL:	22
1.3.1.-	Controlo Mecânico:	23
1.3.2.-	Controlo Químico:	25
1.3.2.1.-	Clorexidina.....	27
1.3.2.2.-	Cloreto de Cetilpiridínio	28
1.3.2.3.-	Triclosan	29
1.3.2.4.-	Óleos Essenciais	30
1.4.-	CONTAMINAÇÃO DAS CERDAS DENTÁRIAS	31
2.	OBJETIVOS.....	36
2.1.	Hipóteses: apenas estas?.....	36
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1.-	Amostra e critérios de inclusão e exclusão	38
3.2.-	Elaboração do questionário	39
3.3.-	Escolha do colutório de eleição	39
3.4.-	Análise microbiológica das cerdas dentárias com e sem desinfeção	41
3.5.-	Análise Estatística	42
4.	RESULTADOS	44
4.1.-	Caraterização da amostra:	44
4.2.-	Caracterização da amostra quanto aos hábitos de higiene oral:	45

4.3.- Caracterização da amostra quanto aos cuidados e manutenção das escovas dentárias:.....	45
4.4.- Seleção do colutório a aplicar como método de desinfecção:	47
4.5.- Resultado da análise das cerdas dentárias dos alunos universitários	48
4.6.- Resultado da análise das cerdas dentárias dos alunos universitários sujeitas ao protocolo de desinfecção:.....	50
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÕES	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
8. ANEXOS.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Formação do biofilme na superfície dentária. A-formação da película; B-adesão inicial; C-maturação; D-dispersão. Adaptado de Huang et al., 2011	20
Figura 2 - Evolução cronológica da escova dentária da esquerda para a direita (A) e figura ilustrativa de diferentes apresentações das cerdas e cabeça da escova dentária (B). Adaptado de http://vancouverdentalgroup.ca/the-history-of-the-toothbrush/	23
Figura 3 - Técnica de Bass modificado, adaptado de http://us-professional.gumbrand.com/proper-brushing-flossing?id=103	24
Figura 4 - Técnica da utilização do fio dentário, adaptado de http://www.oralb.pt-pt/topics/cisforcorrectcheckyourflossingtechnique.aspx#	25
Figura 5 - Estrutura química da molécula de CHX (Mathur et al., 2011)	27
Figura 6 - Estrutura química da molécula do CCP (Zarei, Bagheri Sadeghi, & Abedin, 2013)	28
Figura 7 - Estrutura química da molécula de triclosan (Dann & Hontela, 2011)	29
Figura 8 - Estrutura química das moléculas a) eucaliptol b) salicilato de metila c) mentol d) timol. Adaptado de fonte http://www.dentalcare.com/en-us/dental-education/continuing-education/ce317/ce317.aspx?modulename=coursecontent&partid=3&sectionid=-1 ...	31
Figura 9 - Distribuição das amostras iniciais e finais de cada fase realizada com participantes	38
Figura 11 - Listerine® Dentes & Gengivas (Johnson & Johnson, 2014) – Óleos essenciais	39
Figura 12 - Lacer® Gengivas sensíveis - Triclosan	39
Figura 10 - Colgate® Plax Soft Mint - Cloreto de Cetilpiridínio 0,05%.	39
Figura 13 - Bexident® Gums (ISDIN) - 0,12% de gluconato de clorexidina	39
Figura 14 - - Protocolo experimental para testar a eficácia da desinfecção das cerdas dentárias, contaminadas em laboratório.	41
Figura 15 - Procedimento experimental - Inoculação das escovas dentárias dos alunos universitários e analisados no laboratório.	42
Figura 16 - Distribuição da amostra n=60 por género	44
Figura 17 - Frequência dos alunos com ou sem conhecimentos sobre métodos de desinfecção das escovas dentárias.	46

Figura 18 - Hábitos de limpeza das escovas dentárias após a sua utilização	47
Figura 19 - Crescimento bacteriano, exemplificativo. A - Ágar de MaConkey, B- Gelose de Sangue.....	49
Figura 20 Crescimento microbiano (%) (ufc/escova) nas escovas (n=47) recolhidas dos alunos universitários do ISCSEM.em função dos intervalos de concentração.....	49
Figura 21 Crescimento microbiano, após o protocolo de desinfeção utilizando o colutório Listerine®.....	50
Figura 22 - Distribuição dos valores de contagens dos microrganismo totais (log ufc/escova) nas escovas com desinfeção e sem desinfeção.....	51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Principais espécies residentes da cavidade oral. Adaptado de (Hill & Marsh, 1989; Jorge, 1998; Philip D. Marsh & Matin, 2010).....	15
Tabela 2 - Lista de gêneros da família Enterobacteriaceae com relevância médica, adaptado de (Murray, Rosenthal, & Michael, 2015)	18
Tabela 3 - Espécies fúngicas recolhidas da cavidade oral. Adaptada de (Philip D. Marsh & Matin, 2010)	19
Tabela 4 - Classes de antissépticos e respetiva ação adaptado de (Jafer et al., 2016; Lindhe & Lang, 2003; Philip D. Marsh & Matin, 2010)	26
Tabela 5 - Frequência da escovagem diária.....	45
Tabela 6 - Frequência da substituição das escovas dentárias dos alunos de medicina dentária do ISCSEM.....	45
Tabela 7 - Cuidados com o armazenamento das escovas dos alunos universitários	47
Tabela 8 - Eficácia dos vários colutórios (CHX, CCP, OE e triclosan) contra os microrganismos <i>S. mutans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i> . Branco - Quantidade inoculada ufc/escova; Amostra - Quantidade na escova após 5' de contacto com o colutório ufc/escova.....	48
Tabela 9 - Frequência de crescimento microbianos nas escovas (n=47) usadas pelos alunos universitários do ISCSEM.	48
Tabela 10 - Média e Mediana dos microrganismos da amostra sem desinfeção (n=47) e depois da desinfeção (n=16).....	51

ÍNDICE DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADA	<i>American Dental Association</i>
CCP	Cloreto de Cetilpiridínio
CHX	Clorexidina
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
DGS	Direção Geral de Saúde
FDA	<i>Food & Drugs Association (EUA)</i>
ISCSEM	Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz
OE	Óleos Essenciais
OMS	Organização Mundial de Saúde
RPM	Rotação por minuto
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
UFC	Unidades formadoras por colonias

1. INTRODUÇÃO

As escovas dentárias são os utensílios mais utilizados para a higienização oral. Cobb (1920) reportou que as escovas podem ser um reservatório de microrganismos provenientes da cavidade oral, logo após uma única utilização, e também do meio ambiente onde estão inseridas, representando assim uma fonte de infecção e reinfeção oral (Mialhe, Silva, & Possobon, 2007; Saini & Saini, 2010).

Atualmente, é imensa a informação disponível sobre a importância da higiene oral. No entanto, o mercado dentário está orientado para a divulgação de novos materiais e técnicas, deixando de parte a importante necessidade de cuidados básicos, como por exemplo, o armazenamento, a troca e a desinfecção das escovas dentárias. Segundo a *American Dental Association* (ADA), um dos aspectos importantes para a conservação de uma boca saudável é a preocupação com a manutenção dos instrumentos de higiene oral (Saini & Saini, 2010).

A higienização das escovas dentárias deve ser uma preocupação social inserida num contexto de prevenção de saúde oral, sendo o objetivo principal desta nova conduta a eliminação e a prevenção de infecções orais, tais como a cárie dentária e a doença periodontal. Um dos entraves na utilização de produtos descontaminantes é a necessidade de um cuidado e tempo extra durante a higienização oral, sendo necessário e importante implementar este novo procedimento numa rotina diária (Zão, Silva, & Alves, 2011).

1.1.- MICROBIOTA ORAL

A cavidade oral pode ser considerada como uma entrada para o nosso corpo. É o ponto de partida de alimentos para o trato gastrointestinal e de ar para o sistema respiratório. Apresenta um dos maiores complexos de microrganismos do nosso organismo, onde podemos encontrar mais de 700 espécies diferentes de bactérias, fungos e protozoários. Esta vasta variedade de organismos está relacionada com os vários habitats e os diversos nutrientes disponíveis na cavidade oral (Huang, Li, & Gregory, 2011; Lamont, Jenkinson,

& Hajishengallis, 2014; Philip D. Marsh & Devine, 2011) que podem variar de indivíduo para indivíduo, tornando cada microbioma distinto e único (Wade, 2013).

A cavidade oral apresenta-se estéril durante o período fetal e as primeiras colónias surgem durante o nascimento, que se vão formando e alterando posteriormente por vários fatores e interações externas. Temos como exemplos, erupções dentárias e extrações, tratamentos ortodônticos e protéticos como também a própria dieta e variações no fluxo salivar, dificultando a determinação exata das colónias orais a longo prazo (Lamont et al., 2014; Wade, 2013).

A existência de uma microbiota diversificada permite o estabelecimento de relações comensais entre si e de mutualismo com o hospedeiro, influenciando a saúde do mesmo dentro da cavidade oral e fora, devido à entrada de bactérias para os vasos sanguíneos. Existem evidências que demonstram a proliferação de bactérias orais em outros locais que podem comprometer a saúde geral, contribuindo para doenças como a diabetes, parto prematuro, doenças do sistema cardiovascular, respiratório ou renal (Dewhirst et al., 2010; Seneviratne, Zhang, & Samaranyake, 2011; Wade, 2013).

Grande parte das bactérias são anaeróbias, facultativas ou estritas, podendo ser bactérias Gram-positivo ou Gram-negativo e encontrarem-se sob a forma de cocos e bacilos (tabela 1). Entre esta diversidade de microrganismos são selecionados para o presente trabalho de investigação espécies dentro dos géneros *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, e *Candida* e da família *Enterobacteriaceae*.

Tabela 1 - Principais espécies residentes da cavidade oral. Adaptado de (Hill & Marsh, 1989; Jorge, 1998; Philip D. Marsh & Matin, 2010)

	Gênero	Espécie
Bactérias Anaeróbias restritas	Bacilos Gram Negativo	
	<i>Porphyromonas</i>	<i>P. gingivalis</i> , <i>P. endodontalis</i> , <i>P. catoniae</i>
	<i>Prevotella</i>	<i>P. oralis</i> , <i>P. oris</i> , <i>P. buccae</i> , <i>P. corporis</i> , <i>P. denticola</i> , <i>P. loeschei</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>P. nigrescens</i> , <i>P. melaninogenica</i> ,
	<i>Fusobacterium</i>	<i>F. nucleatum</i> spp. <i>nucleatum</i> , spp. <i>vincentii</i> , spp. <i>polymorphum</i>
	<i>Mitsuokella</i>	<i>M. dentalis</i>
	<i>Selenomonas</i>	<i>S. sputigena</i> , <i>S. noxia</i>
	<i>Campylobacter</i>	<i>C. sputorum</i> , <i>C. rectus</i> , <i>C. curvus</i>
	<i>Treponema</i>	<i>T. denticola</i> , <i>T. vincentii</i> , <i>T. socranski</i>
	<i>Bacteroides</i>	<i>B. forsythus</i>
	Bacilos Gram Positivo	
	<i>Eubacterium</i>	<i>E. alactolyticum</i> , <i>E. lentum</i> , <i>E. yurii</i>
	<i>Propionibacterium</i>	<i>P. acnes</i> , <i>P. propionicum</i> , <i>P. jensenii</i> , <i>P. granulosum</i> , <i>P. avidum</i>
	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. cateniforme</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. oris</i> , <i>L. uli</i> , <i>L. grasseri</i>
	<i>Actinomyces</i>	<i>A. israelii</i> , <i>A. odontolyticus</i> , <i>A. meyeri</i>
<i>Arachnia</i>	<i>A. propionica</i>	
Cocos Gram Negativo		
<i>Veillonella</i>	<i>V. parvula</i> , <i>V. alcalescens</i>	
Cocos Gram Positivo		
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>P. asaccharolyticus</i> , <i>P. magnus</i> , <i>P. micros</i> , <i>P. anaerobius</i> <i>P. prevotii</i>	
Bactérias Anaeróbias Facultativas	Bacilos Gram Negativo	
	<i>Eikenella</i>	<i>E. corrodens</i>
	<i>Capnocytophaga</i>	<i>C. ochracea</i> , <i>C. sputigena</i> , <i>C. gingivalis</i> , <i>C. haemolytica</i> , <i>C. granulosa</i>
	<i>Actinobacillus</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i>
	<i>Haemophilus</i>	<i>H. aphrophilus</i> <i>H. influenzae</i> , <i>H. parainfluenzae</i> , <i>H. paraphrophilus</i> , <i>H. segnis</i>
	Bacilos Gram Positivo	
	<i>Corynebacterium</i>	<i>C. xerosis</i> , <i>C. matruchatii</i>
	<i>Actinomyces</i>	<i>A. naeslundii</i> , <i>A. viscosus</i>
	<i>Rothia</i>	<i>R. dentocariosa</i>
	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. fermentum</i>
	Cocos Gram Negativo	
	<i>Neisseria</i>	<i>N. flavescens</i> , <i>N. mucosa</i> , <i>N. sicca</i> , <i>N. subflava</i>
	<i>Branhamella</i>	<i>B. catarrhalis</i>
	Cocos Gram Positivo	
<i>Streptococcus</i>	<i>S. mutans</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. sobrinus</i> , <i>S. rattus</i> , <i>S. downei</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. milleri</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. constellatus</i>	
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>	
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	

1.1.1.- Streptococcus spp.

Os microrganismos do gênero *Streptococcus* foram os primeiros a ser isolados da flora oral, nomeadamente *Streptococcus mutans*. Estes microrganismos são considerados a espécie mais abundante na cavidade oral (Jenkinson & Lamont, 2005).

Compreendem cerca de 100 espécies e algumas subespécies agrupadas em quatro grupos principais - *mutans*, *mitis*, *salivarius* e *agalactiae*. São cocos esféricos, Gram-positivo, disposto em pares ou cadeias curtas, e a maioria são anaeróbios aerotolerantes. Não produzem esporos, são imóveis e de catalase e oxidase negativas. Apresentam potencial

patogénico com capacidade de afetar vários tecidos (Barroso, Taveira, & Meliço-Silvestre, 2014). O microrganismo *S. mutans* é considerado como o agente major na etiologia cariogénica, contribuindo também para inflamações gengivais (Fardin, Barcelos, Xavier, Paula, & Nunes, 2011; Huang et al., 2011). Em cerca de 50% dos casos de endocardite bacteriana encontram-se *S. mutans* e *S. sanguis* (Gendron, Grenier, & Maheu-Robert, 2000). *S. oralis* é um dos primeiros colonizadores do biofilme bacteriano, encontra-se presente nas mucosas, mesmo antes da erupção dentária. Tal como em *S. mitis*, existe uma grande variabilidade dentro da própria espécie (Lamont & Jenkinson, 2010). Casos de meningite associados a extrações dentárias e endocardites bacterianas (especialmente em indivíduos com próteses valvulares), provocadas pela contaminação de *S. oralis* têm vindo a ser reportadas (Aas, Paster, Stokes, Olsen, & Dewhirst, 2005; Gendron et al., 2000).

1.1.2.- *Staphylococcus spp.*

Os microrganismos do género *Staphylococcus* são cocos Gram-positivo e catalase positiva, anaeróbios facultativos com 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, imóveis, geralmente não-encapsulados e não formam esporos. O seu nome provém da sua característica: *staphylé*, cacho de uvas, *kokkos* de grânulo, na língua grega. Existem cerca de 41 espécies e 24 subespécies do género *Staphylococcus* (Barroso et al., 2014). São denominados de microrganismos oportunistas sendo frequentemente associados a infeções graves. A bactéria *S. aureus* foi a primeira espécie reconhecida como agente patogénico humano e pode ser encontrada frequentemente na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis (Lamont & Jenkinson, 2010; Santos, Leal, Ferreira, Rodrigues, & Castro, 2007).

1.1.3.- *Enterococcus spp.*

Os microrganismos *Enterococcus* são bactérias anaeróbias aerotolerantes que colonizam maioritariamente o cólon, mas podem ser encontrados também por todo o sistema digestivo, na cavidade oral e na vagina (Wang, Zhang, Chu, & Zhu, 2012). São cocos dispostos de forma isolada ou em pares. Apresentam coloração Gram-positivo e catalase

negativa, embora na espécie *E. faecalis*, quando isolada em culturas contendo sangue, pode-se observar uma efervescência débil no teste da catalase (Barroso et al., 2014).

A espécie mais comum de *Enterococcus* é *E. faecalis*. Alguns destes microrganismos são β -hemolíticos, distinguindo-se da maioria dos enterococos, que são α -hemolíticos ou não-hemolíticos (Barroso et al., 2014). Durante muito tempo, os microrganismos *Enterococcus* estiveram incluídos no género *Streptococcus*, sendo designados de *Streptococcus faecalis* e *S. faecium* (Lamont & Jenkinson, 2010).

Os microrganismos *E. faecalis* estão amplamente associados a várias infeções e são responsáveis por 80-90% das infeções causadas por *Enterococcus*, com uma grande capacidade de resistência a antibióticos, nomeadamente a vancomicina e a ampicilina (Van Tyne, Martin, & Gilmore, 2013). Em medicina dentária, vários estudos associam *E. faecalis* com o insucesso dos tratamentos endodônticos e a periodontites apicais, insinuando a sua capacidade de penetração nos túbulos dentinários (Wang et al., 2012).

1.1.4.- Enterobacteriaceae

Segundo Murray, Rosenthal e Michael, (2015) *Enterobacteriaceae* é uma família heterogéneo de bacilos Gram-negativo com maior relevância médica, sendo alguns enumerados na tabela 2.

São bactérias ubíquas e existem mais de 50 espécies e mais de 100 subespécies. Podem ser móveis ou não-móveis, de oxidase negativa e catalase positiva, crescem em aerobiose e anaerobiose (anaeróbicos facultativos). Não formam esporos e apresentam a capacidade de fermentação de lactose e glicose (Murray et al., 2015).

São bactérias oportunistas que pertencem à microbiota humana e de animais de sangue quente. Podem também ser encontradas nas águas, no solo e vegetações por todo o mundo. São responsáveis por um terço das bacteriemias (presença de bactérias no sangue), 70% das infeções do trato urinário e várias doenças intestinais (Murray et al., 2015).

A bactéria *Escherichia coli* foi identificada em 1885 e é a mais comum e importante desta família. É uma bactéria geneticamente diversificada que pode ser inofensiva, ou patogénica quando entra na via sanguínea e se aloja em locais gastrointestinais, ou extraintestinais como o trato urinário e o sistema nervoso central (Croxen et al., 2013). Pode provocar doenças como gastroenterite, infeções urinárias, meningites e *sepsis* (Croxen et al., 2013; Murray et al., 2015).

Tabela 2 - Lista de géneros da família *Enterobacteriaceae* com relevância médica, adaptado de (Murray, Rosenthal, & Michael, 2015)

Enterobacteriaceae importantes clinicamente
<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Citrobacter koseri</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Escherichia coli</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Salmonella</i> serotipo, Typhi, <i>Salmonella nontyphoidal serotypes</i>
<i>Serratia marcescens</i>
<i>Shigella sonnei</i> , <i>Shigella flexneri</i>
<i>Yersinia pestis</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>

1.1.5.- *Candida spp.*

Como já foi referido anteriormente, podem ser encontrados na cavidade oral fungos, organismos eucariotas com parede celular, para além das bactérias. Os fungos, como é o exemplo da *Candida spp.*, apresentam grande capacidade de adaptação a variações de pH, níveis de oxigénio, diferentes temperaturas, e são normalmente encontradas na mucosa dos tratos gastrointestinal e génito-urinário. As espécies fúngicas comumente encontradas na cavidade oral estão descritas na tabela 3 (Philip D. Marsh & Matin, 2010; Schaechter, 2009).

Tabela 3 - Espécies fúngicas recolhidas da cavidade oral. Adaptada de (Philip D. Marsh & Matin, 2010)

Espécie de <i>Candida</i>	Outras Espécies fúngicas (raras)
<i>Candida albicans</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Aspergillus spp.</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Mucor spp.</i>
<i>Candida lusitaniae</i>	<i>Saccharomyces spp.</i>
<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Geotrichum spp.</i>
<i>Candida kefyr</i>	<i>Rhizopus spp.</i>
<i>Candida guilliermondii</i>	
<i>Candida parapsilosis</i>	

Candida também pode ser conhecida como um fungo oportunista por fazer parte da flora comensal em cerca de 35-55% da população, com o potencial patogénico dependendo da predisposição do hospedeiro (Fardin et al., 2011; P. D. Marsh, 2004).

Entre as infeções sistémicas provocadas por fungos, a mais conhecida é a Candidíase, provocada por *Candida albicans*, um fungo que pode apresentar a forma leveduriforme, de pseudo-hifa ou hifa verdadeira. A Candidíase oral é a infeção mais vulgarmente observada em humanos infetados com HIV (Lamont et al., 2014).

Outra característica importante de *C. albicans* é a sua participação na formação do biofilme, que por consequência, conduz a uma entrada direta de células fúngicas para a corrente sanguínea (Kim & Sudbery, 2011).

1.2.- BIOFILME DENTÁRIO

As microcolónias orais encontram-se bem estruturadas e organizadas formando o biofilme oral. Um biofilme é uma película constituída por uma comunidade de células microbianas aderidas a uma substância acelular (Jakubovics & Kolenbrander, 2010).

Esta película pegajosa e densa pode-se encontrar aderida entre si e a estruturas dentárias, cálculos, implantes e outros elementos protéticos, bem como aos tecidos moles. E é composto por bactérias incorporadas numa matriz tridimensional, rica em polissacarídeos e glicoproteínas salivares (Zjinge et al., 2010). Apresenta uma cor branco-amarelada que não é eliminada pela ação da mastigação ou pressão, ao contrário da matéria alba, constituída por restos alimentares, células descamadas, leucócitos e bactérias não aderidas, que é facilmente eliminada com um jato de água (Lamont et al., 2014).

O crescimento e desenvolvimento do biofilme resulta de uma sequência de fases funcionais e estruturais, como ilustrado na figura 1 (Philip D. Marsh, 2006).

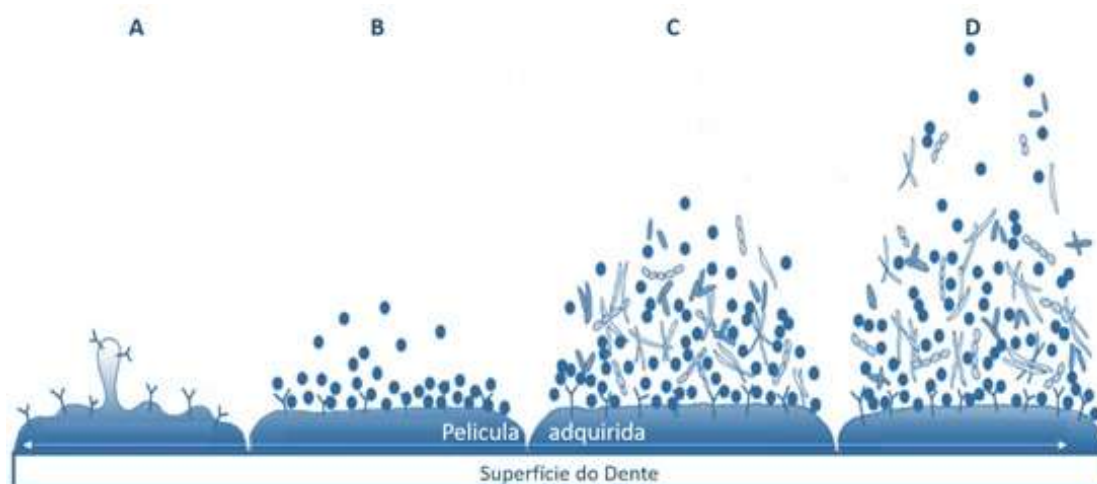


Figura 1 - Formação do biofilme na superfície dentária. A-formação da película; B-adesão inicial; C-maturação; D-dispersão. Adaptado de Huang et al., 2011

A primeira fase de formação do biofilme consiste no depósito de componentes salivares nas superfícies dentárias provenientes das glândulas salivares, formando a película adquirida. Esta película é uma placa electronegativa amorfa que funciona como barreira protetora e fornece lubrificação aos tecidos (Gurenlian, 2007; Huang et al., 2011). Torna

a superfície dentária receptiva à colonização por bactérias específicas, através de moléculas de adesão (Huang et al., 2011; Lamont & Jenkinson, 2010). De seguida, ocorre a fase de adesão inicial, na qual se estabelecem ligações de bactérias pioneiras sobre a película adquirida previamente formada. As proteínas de ligação, como por exemplo a α -amilase, proteínas ricas em prolina e outras glicoproteínas, são reconhecidas e formam ligações eletrostáticas fracas e outros arranjos físicos, permitindo assim a sua reversibilidade (Huang et al., 2011; Seneviratne et al., 2011). As bactérias pioneiras da colonização, denominada de colonização primária, costumam ser *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus oralis*. Com uma semana de colonização, as espécies predominantes no biofilme são *S. mutans*, e passado duas semanas, começa a preponderância de bacilos Gram-negativo (Seneviratne et al., 2011). A fase de maturação da película confere propriedades importantes ao biofilme, nomeadamente o aumento de volume, que nas zonas mais profundas mostra um défice de oxigénio. Existe um desaparecimento de bactérias aeróbias e o aparecimento de outras bactérias secundárias, como *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis* (Gurenlian, 2007; Huang et al., 2011). Na última fase de formação do biofilme, fase de dispersão, podem ser observados cristais na matriz interbacteriana que representam a mineralização dos cálculos (Gurenlian, 2007). As bactérias da camada superficial começam a dispersar em forma de células únicas ou aglomerados por erosão, indo à procura de novos locais para formar novas colónias e à procura de mais nutrientes (Huang et al., 2011).

A interação microbiana na flora oral encontra-se num estado de equilíbrio com diversos fatores ambientais e as defesas do hospedeiro. Esta estabilidade é conhecida por homeostase microbiana (Philip D. Marsh, 2006), a qual só é interrompida se ocorrer uma mudança no ambiente do hospedeiro. Esta alteração conduz a uma invasão dos tecidos do hospedeiro por parte das bactérias do biofilme, destacando a primeira sequela patogénica de uma infeção e consequentemente desencadeando uma resposta inflamatória dos tecidos invadidos e lesões orais, como as cáries dentárias e a doença periodontal (Jenkinson & Lamont, 2005; Philip D. Marsh, 2006; Seneviratne et al., 2011).

1.3.- ESTRATÉGIAS PARA A HIGIENE ORAL:

A prevenção de doenças desempenha um papel proeminente na nossa sociedade. No âmbito da Medicina Dentária, esta baseia-se na conservação da saúde oral, impedindo o desenvolvimento e progressão de lesões orais como por exemplo, a cárie dentária, gengivite e periodontite. A cárie dentária trata-se de uma doença multifatorial, caracterizada pela desmineralização da porção inorgânica e degradação da parte orgânica do dente, devido a uma elevada concentração bacteriana e produção de ácido. Esta ação pode ser diminuída e a estrutura remineralizada com a aplicação de agentes como o flúor (Ferreira-nóbilo & Rosário, 2014).

A periodontite é uma doença que afeta o suporte dentário (gengiva e osso) e é provocado por microrganismos anaeróbios Gram-negativo presentes no biofilme bacteriano. As bactérias mais frequentes são *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Bacteriodes forsythus* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Negrato & Tarzia, 2010).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a cárie dentária continua a ser a doença humana com maior prevalência no mundo, apresentando repercussões significativas a nível individual e socioeconómico. Portugal, mesmo após décadas de campanhas para a saúde oral, ainda se encontra longe de atingir todas as metas europeias da OMS para 2020. Segundo as evidências, a estratégia mais eficaz na prevenção da cárie é a escovagem dos dentes com um dentífrico fluoretado, executada pelo menos duas vezes por dia (DGS, 2008).

A escovagem diária e o uso de fio dentário continuam a ser os mecanismos mais comuns na prevenção de infeções orais e formação do biofilme. Sendo o biofilme dentário responsável por diversas infeções, a sua remoção regular é essencial para manutenção da saúde oral. Mas apesar de não ser possível a sua total eliminação, especialmente a nível interproximal e subgengival, é possível controlar a acumulação deste através de práticas mecânicas, químicas ou uma combinação das duas (Serrano, Escribano, Roldán, Martín, & Herrera, 2015).

1.3.1.- Controlo Mecânico:



Figura 2 - Evolução cronológica da escova dentária da esquerda para a direita (A) e figura ilustrativa de diferentes apresentações das cerdas e cabeça da escova dentária (B). Adaptado de <http://vancouverdentalgroup.ca/the-history-of-the-toothbrush/>

A remoção mecânica representa o método de higiene oral universalmente mais eficaz e mais utilizado (Gonçalo & Mialhe, 2009; Penick, 2004). Historicamente, a higiene oral sempre fez parte da cultura humana. Existem registos que datam desde 3500 a.C., da utilização de palitos de ouro para limpeza oral, panos de linho fino e pedaços de ramos, que ainda hoje são utilizados nos países menos desenvolvidos (Bhat, Hegde, & George, 2003; Penick, 2004).

Dentro dos meios mecânicos para a higiene oral, o mais aceite universalmente, pela sua simplicidade, eficácia e baixo custo é a escova dentária, mas existem outros instrumentos mecânicos de limpeza interproximal como a fita ou o fio dentário e escovilhões (Gebran & Gebert, 2002).

A primeira escova dentária de forma rudimentar foi criada na China, em 1000 A.C., o cabo era feito de osso ou marfim e as cerdas de crina de cavalo ou pelo de porco (Penick, 2004). Depois as cerdas migraram para a Europa mas não houve grandes evoluções nos instrumentos de higiene oral até ao fim do século XVII ou início do século XVIII (Barros, Pernambuco, & Tomita, 2001; Penick, 2004). Em 1780, surgiu um artefacto que se acredita ser o modelo antecessor da escova dentária atualmente utilizada, foi criado pelo inglês William Addis of Clerckenwald. O seu cabo era feito de osso e apresentava buracos numa das extremidades por onde passavam pelos naturais presos por um arame. Este modelo, numa versão mais resistente e polida, foi patenteado e fabricado industrialmente por Wadsworth, em 1857 nos Estados Unidos (Penick, 2004).

Hoje em dia, as cerdas das escovas dentárias são feitas de nylon. As escovas podem ser encontradas numa enorme variedade no mercado, diferenciando-se pela dureza, o número, a altura, a distribuição e angulação das cerdas e a forma da cabeça e do cabo. Segundo a ADA não existe uma escova ideal, sendo que cada uma apresenta as suas características conforme a sua funcionalidade, sendo os requisitos essenciais, o confortável manuseamento e inserção na cavidade oral, e a eficaz remoção do biofilme bacteriano em todas as superfícies necessárias sem danificar os tecidos moles, duros e restaurações dentárias. Deve ser de baixo custo e agradável à vista, ser impermeável à humidade e de fácil limpeza. Ainda recomenda que as escovas satisfatórias possuam cerdas de nylon com comprimento uniforme ao longo de toda a cabeça. Os médicos dentistas são aconselhados a recomendar o tipo de escova consoante as necessidades de cada paciente (JADA, 2007).



Figura 3 - Técnica de Bass modificado, adaptado de <http://us-professional.gumbrand.com/proper-brushing-flossing?id=103>

Existem várias técnicas de escovagem, embora não exista nenhuma técnica ideal e padronizada para todos os indivíduos. O melhor método será adaptar a técnica às necessidades e destreza de cada um. Consoante o movimento realizado e a posição da escova, as técnicas podem ser catalogadas num destes oito métodos: Método Horizontal; Método Vertical (Técnica de Leonard); Método Vibratórios (Técnica de Stillman); Método Rotatório (Técnica de Stillman modificado); Método de Bass; Método de Bass modificado; Método de Characters (Grover, Kaur, Kaushal, & Malhotra, 2012). Atualmente a técnica mais recomendada por profissionais é a técnica de Bass modificada, que consta em movimentos de rotação sucessivos com os filamentos numa angulação de 45° em relação ao longo eixo do dente, conforme demonstrado na figura 3 (Gebran & Gebert, 2002; Grover et al., 2012).

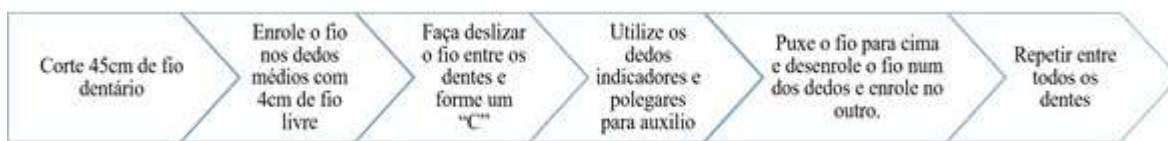


Figura 4 - Técnica da utilização do fio dentário, adaptado de <http://www.oralb.pt/pt-pt/topics/cisforcorrectcheckyourflossingtechnique.aspx#>

Porém, é de salientar que através deste processo não se consegue remover totalmente o biofilme bacteriano existente no espaço interproximal, sendo necessário complementar com uso de fio dentário, ou escovas interproximais (Versteeg, Rosema, Hoenderdos, Slot, & Van der Weijden, 2010). Segundo a ADA o fio apresenta 80% de eficácia na remoção do biofilme destes espaços interproximais (figura 4) (Pedrazzi, Souza, Oliveira, Cimões, & Gusmão, 2009). Mas um estudo de revisão realizado por Versteeg e colaboradores (2015) concluiu que existem evidências que dão preferência às escovas interproximais em comparação com o fio dentário, sendo mais eficaz na remoção do biofilme interproximal e mais aceite pelo paciente, pelo conforto e facilidade de uso.

1.3.2.- Controlo Químico:

O adequado controlo mecânico é uma estratégia de prevenção importante e nunca deve ser substituído, contudo apresenta as suas limitações, devido a falta de destreza ou motivação por parte do paciente (Haas et al., 2014). Sendo assim, é cada vez mais comum a complementaridade de antissépticos orais com a limpeza mecânica para a adequada remoção bacteriana e prevenção de doenças (Haas et al., 2014).

Os antissépticos aparecem no mercado comercial sob a forma de colutórios e dentífricos constituídos por vários componentes comuns: água, álcool, surfactantes, humectantes, aromatizantes e um componente ativo, pertencente a uma das diferentes classes descritas na tabela 4 (Fardin et al., 2011; P. D. Marsh, 2010).

Tabela 4 - Classes de antissépticos e respetiva ação adaptado de (Jafer et al., 2016; Lindhe & Lang, 2003; Philip D. Marsh & Matin, 2010)

Classes	Exemplos	Mecanismo de ação
Biguanidas	Clorexidina	Inibe o transporte de açúcar, a produção de ácidos, o <i>uptake</i> de aminoácidos, a síntese de polissacarídeos, a atividade de proteases, as funções membranares bacterianas.
Enzimas	Dextranase, Glucose oxidase Amiloglicosidase	Inibe a formação da matriz do biofilme por degradação de polissacarídeos bacterianos
Óleos essenciais	Mentol, eucaliptol, Timol	Inibe a produção de ácido
Iões metálicos	Cobre, zinco, estanho	Inibe o transporte de açúcar, a produção de ácido e a atividade de proteases
Moléculas naturais	Extractos de plantas	Inibe a produção de ácido e o transporte de polissacarídeos
Fenóis	Triclosan	Inibe o transporte de açúcar, a produção de ácido e a atividade de proteases
Compostos de amónia quaternários	Cloreto de cetilpiridínio	Inibe enzimas bacterianas e danifica a membrana celular.

Existem evidências que relatam desde há 6000 anos a utilização de uma variedade de fórmulas e produtos de aplicação oral. Muitos dos produtos continham ingredientes que poderiam ter um efeito estimulante da saliva, mascarar a halitose e conter elementos abrasivos, que por sua vez, removiam manchas nos dentes, ou apresentavam ação antimicrobiana. Contudo, muitas destas fórmulas baseavam-se essencialmente em produtos de origem animal e vegetal, não apresentando evidências científicas (Lindhe & Lang, 2003). São exemplos, as bebidas alcoólicas (vinho branco e cerveja) vulgarmente utilizados como elixires bucais, especialmente na população Romana, e a própria urina, popular entre várias comunidades durante vários séculos (Lindhe & Lang, 2003).

São vários os agentes químicos descritos na literatura como essenciais na desinfecção, por serem considerados métodos eficazes e de baixo custo (Gonçalo & Mialhe, 2009). Os agentes químicos selecionados para o presente projeto de investigação foram colutórios orais contendo clorexidina, cloreto cetilpiridínio, triclosan e os óleos essenciais.

1.3.2.1.- Clorexidina

A estrutura da clorexidina (CHX), representada na figura 5, é catalogada como a *gold standard* entre os vários antissépticos orais em Medicina Dentária. Consiste numa bisguanina simétrica, disponível em três formas de apresentação: acetato, sais de hidrocloreto e digluconato de clorexidina. A forma mais aplicada em Medicina Dentária e comercializada é a de digluconato, devido à sua solubilidade e afinidade com álcool (Jafer et al., 2016; Mathur, Mathur, Srivastava, & Khatri, 2011).

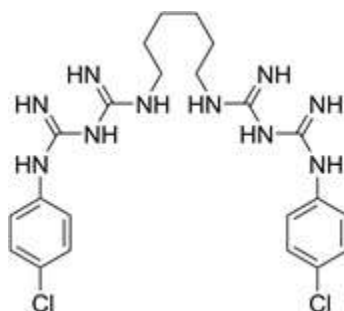


Figura 5 - Estrutura química da molécula de CHX (Mathur et al., 2011)

Uma das suas principais características é a sua elevada substantividade aos tecidos orais, propriedade química que permite manter o componente ativo ligado a um local ou tecido prolongadamente, libertando esta substância ainda em concentrações suficientes para uma ação bacteriostática desejada. Estudos demonstram que cerca de 30% de uma dose do colutório oral permanece na cavidade (P. D. Marsh, 2010).

É um antisséptico sintético vastamente estudado, com amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivo, Gram-negativo, fungos e leveduras.

O seu mecanismo de ação deve-se à sua natureza dicatiónica, que torna a molécula muito interativa com os compostos de fosfato aniónico das moléculas lipídicas presentes na membrana celular, e ainda pode apresentar características bactericidas ou bacteriostáticas consoante a sua concentração (P. D. Marsh, 2010; Mathur et al., 2011):

- Bacteriostática: em concentrações baixas que variam entre 0,02% - 0,06%. A CHX interfere com o metabolismo bacteriano, inibindo funções membranares, como o transporte de hidratos de carbono (açúcares), produção de ácidos e inibição de enzimas;

- Bactericida: em concentrações altas que variam entre 0,12% - 0,2%. A CHX provoca morte celular por citólise, por aumentar a permeabilidade da parede celular das bactérias, o que permite a penetração de compostos de CHX na membrana citoplasmática, desencadeando a precipitação de moléculas com baixo peso molecular.

Apesar do seu amplo uso terapêutico, a sua utilização oral deve ser limitada ou intervalada devido aos efeitos adversos associados, como a coloração castanho-amarelado dos dentes e a alteração transitória do paladar. O uso regular a longo prazo pode ser recomendado a pacientes com um risco mais elevado de cáries ou com incapacidade física ou mental de realizar uma higienização oral eficaz. O regime de utilização é aconselhado pelo médico dentista e adaptado individualmente (Balagopal & Arjunker, 2013; Mathur et al., 2011; Varoni, Tarce, Lodi, & Carrassi, 2012).

1.3.2.2.- Cloreto de Cetilpiridínio

O cloreto de cetilpiridínio (CCP) (figura 6) é um composto de amónia quaternário catiónico com um amplo espectro de ação contra bactérias Gram-negativo, com classificação Classe I na eficácia e segurança segundo a *Food & Drug Administration* (FDA) (USA) (Sreenivasan, Haraszthy, & Zambon, 2013).

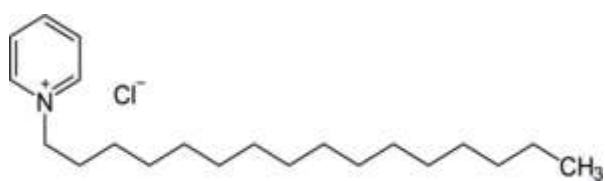


Figura 6 - Estrutura química da molécula do CCP (Zarei, Bagheri Sadeghi, & Abedin, 2013)

A carga positiva da molécula de CCP facilita a sua interação e atividade antimicrobiana nas superfícies bacterianas carregadas negativamente. A molécula interrompe o metabolismo bacteriano e inibe o seu crescimento ao provocar rutura e libertação de componentes celulares. (Feres, Figueiredo, Faveri, Stewart, & Vizio, 2011; Sreenivasan et al., 2013).

Alves e colaboradores (2012) afirmam que o CCP fornece um significativo benefício da redução do biofilme bacteriano e inflamação gengival quando conjugado com a higiene oral mecânica.

1.3.2.3.- Triclosan

O triclosan é o agente químico antibacteriano bifenólico mais potente da classe dos fenóis, com largo espectro de ação (Gram-positivo e Gram-negativo) que atua como inibidor do crescimento de fungos, vírus e sobretudo bactérias. O triclosan (figura 7) é um composto químico não iônico, solúvel em etanol e éter etílico, o que lhe fornece a compatibilidade com as várias formulações dos diversos produtos de higiene oral (Fardin et al., 2011; Lindhe & Lang, 2003; Teles & Teles, 2009).

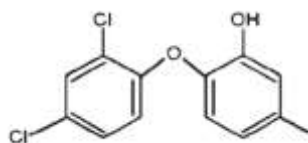


Figura 7 - Estrutura química da molécula de triclosan (Dann & Hontela, 2011)

O triclosan tem a capacidade de redução da acumulação da placa, contudo a sua eficácia está dependente da associação de outras substâncias na sua fórmula para aumentar e controlar a sua retenção. Ou seja, os copolímeros, como grantrez 0,2%, citrato de zinco ou pirofosfato de sódio, têm a capacidade de aumentar a substantividade do triclosan nas superfícies dentárias, saliva e nas mucosas orais e assim leva a uma redução da acumulação de biofilme mais eficiente (Fardin et al., 2011; Gebran & Gebert, 2002; Lindhe & Lang, 2003; Teles & Teles, 2009).

Como característica adicional, o triclosan tem comprovadas propriedades anti-inflamatórias (Kats et al., 2013; Lindhe & Lang, 2003; Philip D. Marsh & Matin, 2010). Vários estudos testaram a capacidade do triclosan na redução da produção de prostaglandina E2 (PGE2), um mediador potente na inflamação, e na redução da expressão de mPGES-1 (prostaglandina E sintase-1), uma enzima microssomal que catalisa a fase terminal da biossíntese da PGE nos fibroblastos gengivais. Ou seja, o

triclosan pode prestar benefícios na doença periodontal e na redução da inflamação gengival (Kats et al., 2013).

A ação bactericida ou bacteriostática do triclosan depende da concentração do mesmo (Russell, 2004), tal como a clorexidina. Vários estudos realizados com *E. coli* e *S. aureus* insinuem que o triclosan atua num local específico das bactérias, inibindo a síntese de ácidos gordos, pelo bloqueio da proteína FabI (Enzima NADH dependente enoil redutase) - proteína transportadora de acil. A enzima FabI é responsável pelo alongamento das cadeias dos ácidos gordos das bactérias, a inibição desta via provoca indiretamente a rutura da membrana celular que leva conseqüentemente à sua morte. Outras vias biossintéticas dependentes desta enzima vão estar também afetadas, como são a síntese de fosfolípidos, lipoproteínas e lipossacáridos (componentes da parede celular) (Heath et al., 1999; Russell, 2004; Schweizer, 2001).

1.3.2.4.- Óleos Essenciais

Os óleos essenciais (OE) são misturas naturais, voláteis e complexas, com forte odor, extraídos de plantas aromáticas normalmente provenientes de países quentes que os produzem durante o metabolismo secundário (Lopez-Romero, González-Ríos, Borges, & Simões, 2015).

Mais de 3000 OE foram identificados e só 10% são reconhecidos como seguros pela FDA e utilizados para fins terapêuticos, cosméticos ou alimentares (Lopez-Romero et al., 2015). Os OE, tais como o mentol, timol, eucaliptol e salicilato de metila (figura 8), têm sido incorporados em colutórios orais que datam até mais de 100 anos (Lindhe & Lang, 2003).

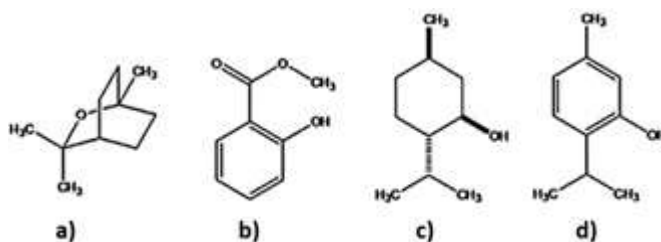


Figura 8 - Estrutura química das moléculas a) eucaliptol b) salicilato de metila c) mentol d) timol.

Adaptado de fonte <http://www.dentalcare.com/en-us/dental-education/continuing-education/ce317/ce317.aspx?modulename=coursecontent&partid=3§ionid=-1>.

Estudos indicam que os OE têm a capacidade de penetrar a massa complexa do biofilme oral e exercer a sua atividade antimicrobiana dentro do mesmo, inibindo, também, a agregação de novas bactérias Gram-positivo às bactérias pioneiras. Este processo pode diminuir a maturação do biofilme dentário, diminuindo a sua densidade e por sua vez a patogenicidade. Os OE ainda possuem a capacidade de extrair endotoxinas das bactérias Gram-negativo e ter ação contra leveduras (Teles & Teles, 2009). O seu mecanismo de ação envolve degradação da parede celular e inibição enzimática, provocando fuga de componentes celulares (Gebran & Gebert, 2002; Lopez-Romero et al., 2015).

Apesar dos OE não apresentarem a mesma eficácia que a clorexidina (Haas et al., 2014; P. D. Marsh, 2010), estudos comprovam que em pacientes submetidos a tratamentos ortodônticos, a indicação de utilização de OE de uso diário prolongado pode ser uma opção para a prevenção das inflamações gengivais provocada pela acumulação do biofilme bacteriano. Para tratar inflamações gengivais transitórias, a receita de clorexidina seria mais indicada (Haas et al., 2014).

1.4.- CONTAMINAÇÃO DAS CERDAS DENTÁRIAS

O termo contaminação refere-se à retenção e sobrevivência de organismos infecciosos que possam ocorrer em objetos animados ou inanimados. Em relação à contaminação da escova dentária é praticamente impossível de se evitar, surge após a primeira utilização e aumenta com o uso repetitivo (Camargo, Schimim, Alves, & Chibinski, 2013; Frazelle & Munro, 2012). O primeiro estudo acerca desta contaminação foi realizado em 1920 por

Cobb e Mass, mas só se começou a dar a devida importância e esta problemática no final da década de 70 (Camargo et al., 2013; Júnior et al., 2011).

A contaminação das escovas é dada não só pela sua utilização como também pelo manuseamento e aerossóis provenientes do meio ambiente onde a escova é conservada (Basman et al., 2016; Frazelle & Munro, 2012), tornando as escovas num reservatório de microrganismos e fonte de inoculação e/ou reintrodução de agentes patogénicos na cavidade oral (Queiroz et al., 2013). O risco de infeção aumenta potencialmente com a falta de descontaminação, o que pode levar conseqüentemente a problemas orais ou sistémicos, tais como, a cárie dentária, sífilis, difteria, Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA), tuberculose (Camargo et al., 2013; Gonçalo & Mialhe, 2009; Júnior et al., 2011) hepatite B e herpes vírus tipo 1 (HSV-1) (Sato et al., 2004). Por exemplo, o HSV-1 pode permanecer pelo menos 48 horas nas escovas dentárias secas e mais de uma semana em escovas húmidas, mantendo-se ativo e transmissível (Júnior et al., 2011).

São vários os cuidados possíveis para diminuir a carga microbiana nas escovas, mas esta informação não é devidamente divulgada (Komiyama, Back-Brito, Balducci, & Koga-Ito, 2010). Segundo Devine e colaboradores (2007) existe uma grande necessidade de implementar estratégias e métodos desinfetantes que sejam eficazes, económicos, não-tóxicos e de fácil manuseamento. A ADA afirma que são diversos os cuidados que podem ser seguidos para diminuir esta contaminação, tais como (Gonçalo & Mialhe, 2009):

- Trocar as escovas a cada 3-4 meses ou antes, se as cerdas começarem a ficar divergentes;
- Acondioná-las na posição vertical num local limpo, seco e arejado, pois a humidade favorece o crescimento microbiano;
- Após cada utilização deve-se lavar a escova, incluindo o cabo, com água corrente;
- Deve-se remover o excesso de água da escova, evitando a utilização de toalhas para a secagem.
- É desaconselhado a partilha das escovas dentárias, para se evitar a transmissão de microrganismos;

Todos os cuidados são importantes, especialmente em grupos de alto risco e indivíduos imunodeprimidos. Nestes grupos, a ADA sugere a submersão das escovas em agentes antimicrobianos orais, trocar de escova com maior frequência (Basman et al., 2016).

A maioria dos métodos alternativos para a desinfecção das escovas dentárias, recorre à utilização de agentes químicos devido às suas propriedades antimicrobianas, porém, vários estudos relatam a eficácia antimicrobiana através de métodos físicos (Janković, Milošev, & Novaković, 2014; Peker, Akca, Sarikir, Toraman Alkurt, & Celik, 2014)

Métodos químicos:

Dos métodos químicos podemos citar, o CCP, a CHX a 0,12%, os OE e o triclosan, descritos anteriormente, e ainda o hipoclorito de sódio, o peróxido de hidrogénio, (Basman et al., 2016; Queiroz et al., 2013), o vinagre branco ou o álcool a 50% (Basman et al., 2016).

Os colutórios orais contendo CHX ou CCP são os antissépticos mais procurados devido a sua inibição na formação do biofilme. Vários autores procuram estabelecer protocolos de desinfecção das escovas com estes agentes (Nascimento et al., 2014). Sugerem que crianças, adultos e grupos de risco podem beneficiar da prática rotineira da desinfecção das escovas com antissépticos contendo CHX. O antisséptico triclosan também se pode apresentar como uma opção de fácil utilização, eficaz e não-tóxico com ação contra *S. mutans*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* e *C. albicans* (Komiya et al., 2010). Tal como os OE que têm efeito antibacteriano contra *S. mutans*, *S. aureus* e *E. coli* mas não contra *L. Rhamnosus* (Basman et al., 2016).

O hipoclorito de sódio a 0,08-1% é uma opção recorrente devido ao seu fácil acesso, baixo custo e propriedades bactericidas (Busato, Cavazzola, Ortega, Guaré, & Neto, 2015; Fardin et al., 2011). É um forte agente que oxida irreversivelmente elementos de enzimas funcionais desregulando o metabolismo de bactérias como, *E. coli*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. faecalis* (Busato et al., 2015; Naik, Mujib, Telagi, Anil, & Spoorthi, 2015) e *S. mutans* (Queiroz et al., 2013). Contudo, autores apontam a necessidade de mais estudos acerca dos seus efeitos secundários nas cerdas dentárias e mucosas orais (Queiroz et al., 2013), tal como a utilização do desinfetante peróxido de hidrogénio. O seu uso

descuidado pode desequilibrar a microbiota oral e provocar irritações nas mucosas (Gebran & Gebert, 2002).

Métodos físicos:

Como exemplos dos métodos físicos temos a radiação do micro-ondas e luz ultravioleta (UV).

- **Luz UV:** Para além dos agentes químicos, pode-se recorrer a outros procedimentos de descontaminação como a utilização de luz UV (Nelson-Filho et al., 2000; Sato et al., 2004). De acordo com Devine e colaboradores (2007) a esterilização com luz UV apresenta-se um método rápido e eficaz, mas de elevado custo (Komiya et al., 2010), porém, são encontrados vários métodos deste género no mercado. A eficácia destes métodos é dada pela emissão de um raio de luz UV e calor seco de forma constante (Ankola, Hebbal, & Eshwar, 2009). Berger e colaboradores (2008) obtiveram uma redução de 83% de bactérias Gram-negativo e 100% de bactérias Gram-positivo retidas nas escovas dentárias depois de uma exposição de luz UV durante 10 minutos (Peker et al., 2014).
- **Radiação de Micro-ondas:** Os micro-ondas emitem ondas eletromagnéticas não-ionizantes de 915 a 2450 MHz. Quando as ondas entram em contacto com os microrganismos produzem-se dois tipos de efeitos: térmico e não-térmico. O efeito térmico é dado pela absorção da energia pelas moléculas que provoca um efeito vibratório de grande velocidade e conseqüentemente sobreaquecimento. Este efeito é obtido com certas frequências de alta energia por longos períodos de tempo, sendo capaz de matar bactérias e leveduras. Pensa-se que o mecanismo de ação do efeito não-térmico é devido a alterações provocadas nas estruturas secundárias e terciárias de proteínas (Janković et al., 2014).

Em 1985, Rohrer e Bulard recorreram pela primeira vez ao uso de micro-ondas para a descontaminação de instrumentos dentários (Junior & Pallos, 2001). Posteriormente foram efetuados estudos com resinas acrílicas, próteses dentárias e escovas dentárias (Peker et al., 2014; Spolidorio et al., 2011). Quanto às escovas dentárias, alguns estudos

comprovaram eficácia do uso da radiação dos micro-ondas contra *E. coli*, *Bacillus subtilis* (Junior & Pallos, 2001), *S. aureus*, *S. mutans*, *C. albicans*, (Peker et al., 2014; Spolidorio et al., 2011) e *L. rhamnosus* (Peker et al., 2014) podendo ser considerado um método alternativo simples, eficaz e de baixo custo (Naik et al., 2015).

2. OBJETIVOS

Avaliar o conhecimento dos alunos sobre o tema de descontaminação das escovas dentárias através de um inquérito.

Verificar que as cerdas de escovas dentárias podem ser reservatórios de microrganismos utilizando as escovas dentárias dos alunos universitários da ISCSEM.

Testar, em laboratório, a eficácia de uma descontaminação com desinfetantes contendo clorexidina 0,12%, triclosan, cloreto cetilpiridínio 0,05% e os óleos essenciais (timol, eucaliptol, mentol, salicilato de metilo) em cerdas de escovas dentárias contaminadas artificialmente com estirpes de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Klebsiella* e *Candida*.

Testar, em contexto real, com os alunos universitários da ISCSEM, um protocolo de desinfeção das escovas dentárias utilizando o colutório que obteve os melhores resultados *in vitro*,

2.1. Hipóteses:

Hipóteses I:

H0 - O protocolo de desinfeção aplicado não é eficiente.

H1 - O protocolo de desinfeção aplicado é eficiente.

Hipóteses II:

H0 – As escovas dentárias não são reservatórios de microrganismos.

H1 - As escovas dentárias são reservatórios de microrganismos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.- Amostra e critérios de inclusão e exclusão

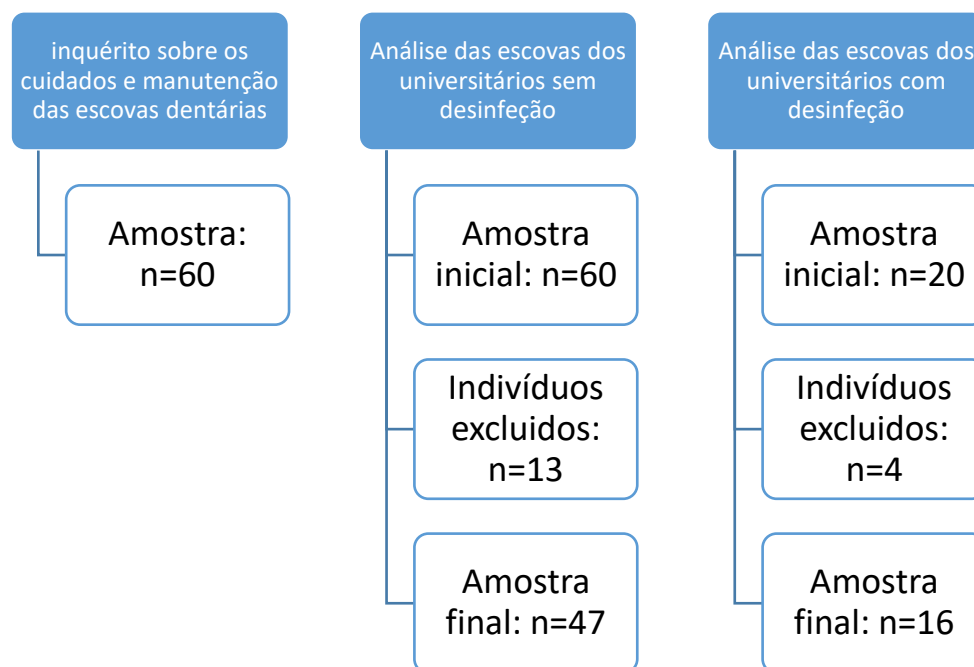


Figura 9 - Distribuição das amostras iniciais e finais de cada fase realizada com participantes

A população alvo foi composta somente por alunos do 5º ano de Medicina Dentária do ISCSEM, formando uma amostra total de 60 indivíduos na primeira fase *in vivo*, e 20 na segunda fase *in vivo*. Na figura 9 pode-se observar a distribuição das amostras iniciais e finais.

Neste estudo, alguns critérios de inclusão e exclusão foram estabelecidos e respeitados:

Critérios de inclusão: Ser aluno matriculado no último ano de mestrado integrado de Medicina Dentária do ISCSEM; Ter lido e assinado o consentimento informado;

Critérios de exclusão: Alunos sob o efeito de antibióticos, antifúngicos e o inadequado cumprimento do protocolo proposto;

3.2.- Elaboração do questionário

Foi distribuído aos alunos (n=60) um questionário anónimo, constituído por onze perguntas de carácter fechado e semi-aberto. Os temas abordavam os hábitos de higiene oral, cuidados e manutenção das escovas dentárias e conhecimentos sobre métodos de desinfeção das escovas.

A elaboração do questionário teve por base a versão portuguesa do *Hiroshima University Dental Behavioural Inventory* (HU-DBI) (Albuquerque, Bernardo, Simão, Ferreira, Kawamura & Okada, 2011).

3.3.- Escolha do colutório de eleição

Para saber o colutório a ser utilizado na fase experimental de desinfeção das escovas dos voluntários foi necessário eleger o colutório que mais eficazmente elimina os microrganismos (figura 10-13).



Figura 12 -
Listerine®
Dentes &
Gengivas
(Johnson &
Johnson, 2014) –
Óleos essenciais



Figura 11 - Lacer® Gengivas
sensíveis - Triclosan



Figura 10 -
Colgate® Plax
Soft Mint -
Cloreto de
Cetilpiridinio
0,05%.



Figura 13 - Bexident®
Gums (ISDIN) - 0,12% de
gluconato de clorexidina

Procedimento:

Foi testada a eficácia dos colutórios anteriormente descritos na eliminação das bactérias *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, e na eliminação da levedura *Candida albicans*.

Foram preparadas suspensões com um conteúdo bacteriano aproximado de 10^8 ufc/ml (B1) de cada um dos microrganismos testados (figura 14). De seguida, foram realizadas diluições decimais, obtendo-se concentrações de 10^6 , 10^4 e diluição final de 10^3 ufc/ml (B.2, B.3 e B.4 respetivamente). Foram inoculados 100 μ l da suspensão de 10^3 de cada microrganismo num dos meios TSA (Trypticase soy agar), Sabouraud (*Candida albicans*) ou Gelose de sangue (*Streptococcus mutans*) para a sua correta quantificação. Das suspensões de 10^8 , inocularam-se 100 μ l nas cerdas da escova dentária (D) (uma para cada microrganismo).

Depois de as cerdas secarem submergiram-se as mesmas num coletor universal com 5 ml do antisséptico (E), mantendo-se em contacto 5 minutos.

Após os 5 minutos as escovas foram colocadas num recipiente com 5 ml de água destilada esterilizada (F), mantendo-se em agitação vigorosa manual durante 2 minutos. A partir desta nova solução foram inoculados 100 μ l em TSA ou Sabouraud ou Gelose de sangue que representará a “Amostra” (G).

Todos os meios foram incubados a 37°C, durante 24h para os meios: Sabouraud e TSA e 48h para Gelose de sangue. A gelose de sangue foi incubada em atmosfera anaeróbia.

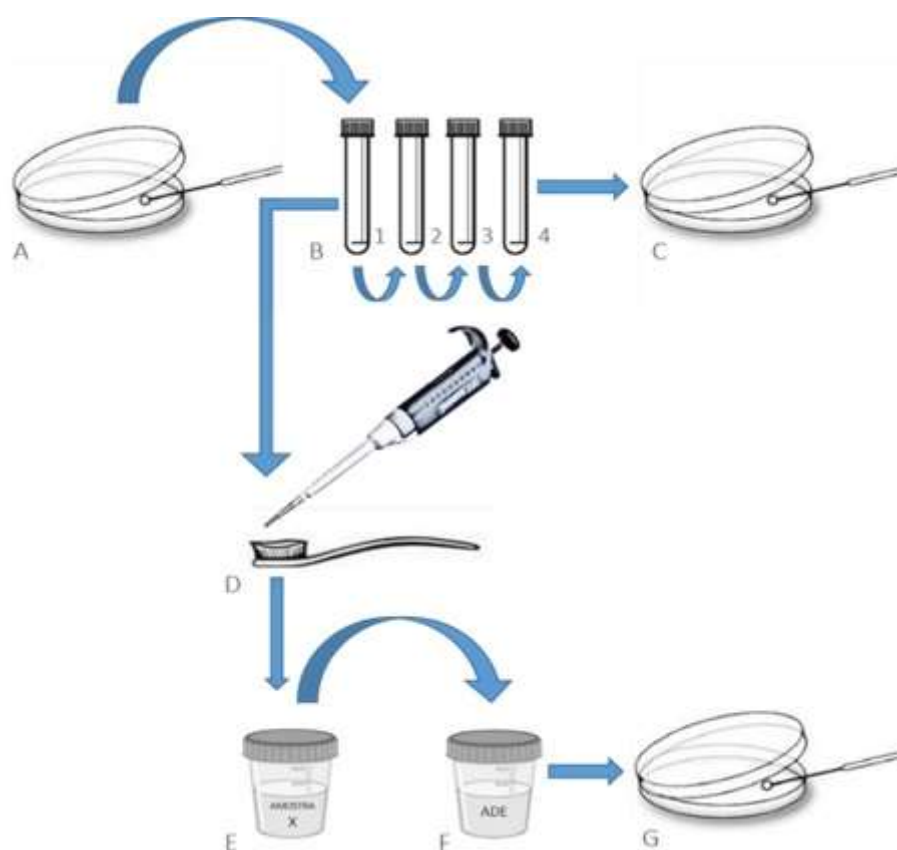


Figura 14 - - Protocolo experimental para testar a eficácia da desinfecção das cerdas dentárias, contaminadas em laboratório.

3.4.- Análise microbiológica das cerdas dentárias com e sem desinfecção

A cada voluntário foi entregue uma escova de dentes da Happy Morning® embalada, juntamente com o questionário e consentimento informado, e indicações para, durante três semanas seguidas, manter os seus hábitos de higiene habituais substituindo somente a sua escova pela escova fornecida,. Após as três semanas, as escovas foram recolhidas em mangas previamente esterilizadas e analisadas no laboratório de microbiologia aplicada do ISCSEM.

Como se pode verificar na figura 15, cada escova foi colocada num tubo com 15 ml água destilada (A) e agitada durante 20 minutos a 130 RPM (B). Posteriormente foram inoculados 200µl desta suspensão nos meios de cultura Mitis Salivarius agar, Gelose de Chapman, TSA, Gelose de sangue, Gelose MacConkey, Agar Sabouraud e Gelose

chromID™ Candida. Os meios foram incubados a 37°C durante 24h ou 48h. Os meios de Mitis Salivarius agar e Gelose de sangue foram incubados em atmosfera de anaerobiose.

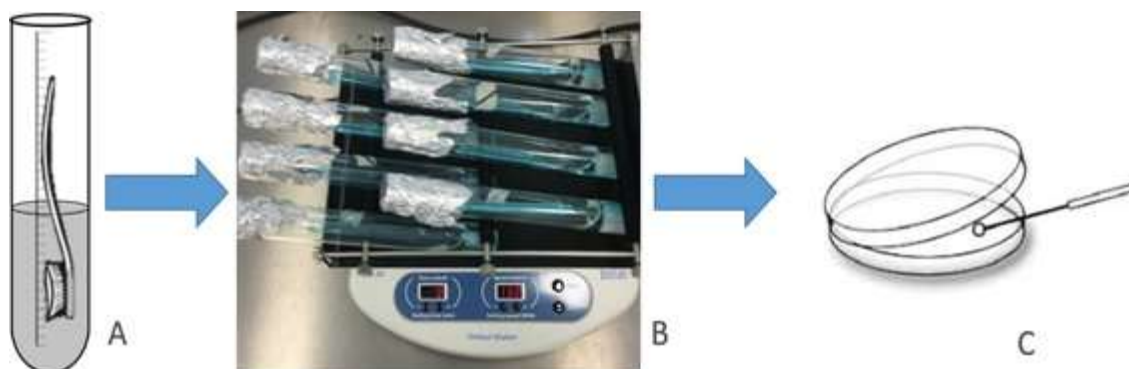


Figura 15 - Procedimento experimental - Inoculação das escovas dentárias dos alunos universitários e analisados no laboratório.

Posteriormente foram entregues a alguns dos mesmos voluntários novas escovas dentárias da Happy Morning®, uma embalagem da Listerine® de 500ml e novas instruções de utilização indicando que após terminar a escovagem realizada o voluntário tinha que submergir as cerdas em 20ml do colutório durante 5 minutos e deixar secar na posição vertical. Estes procedimentos foram efetuados durante 3 semanas.

As escovas foram recolhidas em mangas previamente esterilizadas, e analisadas no laboratório de microbiologia aplicada do ISCSEM, seguindo o mesmo protocolo anteriormente descrito e ilustrado na figura 15.

3.5.- Análise Estatística

A análise dos dados foi efetuada com o programa IBM SPSS v. 23.0, envolvendo metodologias de análise descritiva e inferencial (teste de Mann-Whitney). Neste último caso foi considerado um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1.- Caraterização da amostra:

A amostra inicial deste estudo era constituída por 60 alunos universitários do ISCSEM, com idades compreendidas entre os 22 e 40 anos, com uma idade média de 24 anos, e com um predomínio do género feminino (73%) conforme indicado na figura 16.

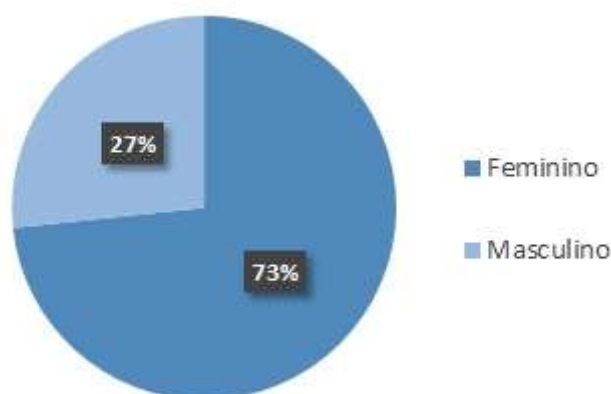


Figura 16 - Distribuição da amostra n=60 por género

Quanto às patologias, apenas 2 (3%) dos participantes referiu ter uma doença sendo diabetes e a doença de Basedow-Graves as indicadas.

Na primeira fase do estudo realizado *in vivo*, foram distribuídas 60 escovas pelos voluntários, mas 13 indivíduos foram excluídos da amostra pelo incumprimento dos critérios de inclusão, tais como: esquecimento, incorreto seguimento da metodologia e perda da escova. Como tal, obteve-se uma amostra final de n=47. Na segunda fase do estudo *in vivo*, foram distribuídas 20 escovas com uma embalagem de Listerine® de 500ml a 20 dos participantes da primeira fase. Da amostra inicial (n=20), alguns indivíduos (n=4) foram excluídos pelo incorreto seguimento da metodologia proposta, obtendo-se uma amostra final de n=16.

4.2.- Caracterização da amostra quanto aos hábitos de higiene oral:

Em relação aos seus hábitos de higiene oral, avaliou-se a frequência dos cuidados orais diários dos alunos universitários, apresentada na tabela 5. Verificou-se que a maioria, 57%, escovam os dentes duas vezes por dia.

Tabela 5 - Frequência da escovagem diária

Frequência	Alunos universitários (n=60)	(%)
1 vez por dia	0	0
2 vezes por dia	34	57
3 vezes por dia	23	38
>3 vezes por dia	3	5

Quanto à metodologia de escovagem, conclui-se que 95% dos alunos utiliza a técnica de “Bass modificada” para realizar a sua higienização oral e 5% utiliza outros métodos - “Stillman modificado”, “método manual” e método de “vai-vem” juntamente com o “circular”.

4.3.- Caracterização da amostra quanto aos cuidados e manutenção das escovas dentárias:

Na tabela 6 podemos observar a frequência da troca das escovas dentárias dos alunos universitários.

Tabela 6 - Frequência da substituição das escovas dentárias dos alunos de medicina dentária do ISCSEM.

Frequência	Alunos universitários (n=60)	(%)
------------	---------------------------------	-----

<1 mês	6	10
2 a 3 meses	38	64
6 em 6 meses	14	23
1 ano	2	3
Mais de um ano	0	0

Em relação aos conhecimentos sobre métodos de desinfeção, cujos resultados se evidenciam na figura 17, constatou-se que apenas 15% referiram possuir conhecimento nesta área, tendo sido descritos diversos métodos como água com sabão, CHX, peróxido de hidrogénio, hipoclorito de sódio, álcool e colutórios orais.

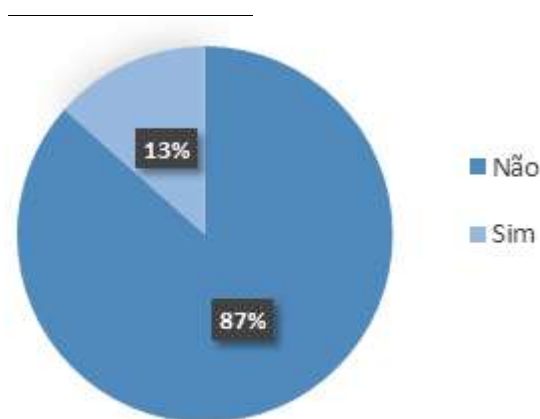


Figura 17 - Frequência dos alunos com ou sem conhecimentos sobre métodos de desinfeção das escovas dentárias.

Independentemente do conhecimento de métodos de desinfeção, avaliou-se a prática de hábitos de limpeza e cuidados com as escovas dentárias (figura 18), onde se constatou que a maioria (58%) dos voluntários referem que lavam a cabeça da escova com água corrente e os restantes, para além desta passagem, complementam com outra opção.

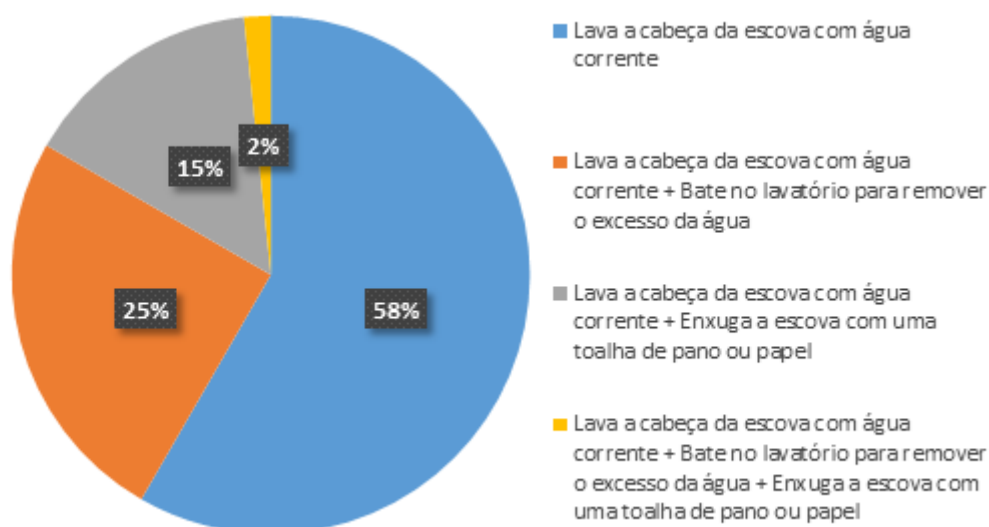


Figura 18 - Hábitos de limpeza das escovas dentárias após a sua utilização

No armazenamento das escovas dentárias (tabela 7), verificou-se que a maioria (53%) opta por colocar a escova num copo, em cima do lavatório, sem tampa.

Tabela 7 - Cuidados com o armazenamento das escovas dos alunos universitários

Método	Alunos universitários (n=60)	(%)
Deitada em cima da pia	3	5
Num copo em cima da pia, sem tampa	32	53
Num copo em cima da pia, com tampa	16	27
Dentro do armário	5	8
Outro	4	7

4.4.- Seleção do colutório a aplicar como método de desinfeção:

Após a inoculação *in vitro* das escovas com as bactérias *S. mutans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* e levedura *C. albicans*, e submersão por 5 min das escovas contaminadas nos antissépticos CHX, CCP, OE e triclosan, avaliou-se o crescimento bacteriano em meios de cultura adequados. Os resultados estão apresentados na tabela 8, onde “Branco” representa a quantidade inoculada expressa em ufc/escova e “Amostra” representa a

quantidade que permaneceu na escova após 5 minutos de contacto com os colutórios (ufc/escova).

Tabela 8 - Eficácia dos vários colutórios (CHX, CCP, OE e triclosan) na eliminação dos microrganismos *S. mutans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *C. albicans*. Branco - Quantidade inoculada, ufc/escova; Amostra - Quantidade na escova após 5' de contacto com o colutório, ufc/escova

	CHX		CCP		OE		Triclosan	
	Branco	Amostra	Branco	Amostra	Branco	Amostra	Branco	Amostra
<i>S. mutans</i>	2,2x10 ⁸	<5x10	1,0x10 ⁸	<5x10	8,4x10 ⁸	<5x10	1,6x10 ⁸	1,2x10 ⁵
<i>S. aureus</i>	1,2x10 ⁶	2,5x10 ³	3,2x10 ⁶	<5x10	6,0x10 ⁵	<5x10	2,9x10 ⁶	<5x10
<i>E. faecalis</i>	3,0x10 ⁵	<5x10	7,3x10 ⁶	<5x10	2,0x10 ⁵	<5x10	8,1x10 ⁶	<5x10
<i>E. coli</i>	7,0x10 ⁵	<5x10	1,0x10 ⁵	<5x10	7,0x10 ⁵	<5x10	9,0x10 ⁵	<5x10
<i>C. albicans</i>	1,0x10 ⁵	<5x10	1,0x10 ⁵	6,5x10 ²	4,0x10 ⁵	<5x10	1,9x10 ⁶	4,0x10 ³

Como o colutório de OE foi o que obteve melhores resultados *in vitro* foi o eleito para o estudo *in vivo*.

4.5.- Resultado da análise das cerdas dentárias dos alunos universitários

Na primeira experiência com os voluntários, só 47 das 60 escovas foram devidamente utilizadas e recolhidas. Em todas as amostras verificou-se crescimento de alguma espécie microbiana, sendo as leveduras o microrganismo menos presente (8,6%), tabela 9.

Tabela 9 - Frequência de crescimento microbianos nas escovas (n=47) usadas pelos alunos universitários do ISCSEM.

Microrganismo	Frequência	
	(Número de amostras positivas)	Frequência (%)
<i>Streptococcus orais</i>	33	70,2
<i>Staphylococcus spp.</i>	30	63,8
<i>Enterobacteriaceae</i>	42	84,4
<i>Candida spp.</i>	4	8,6

O crescimento microbiano observado das escovas recolhidas dos alunos universitários (n=47) variou bastante (figura 19) tendo-se definido intervalos de concentração, adaptados dos valores do estudo realizado por Rodrigues, Motter, Pegoraro, Menoli, & Menolli (2012) (Rodrigues et al., 2012). Assim definiram-se quatro intervalos:

- $X < 100$ ufc/escova;
- $100 \leq X < 3000$ ufc/escova;
- $3000 \leq X < 10000$ ufc/escova;
- $X \geq 10000$ ufc/escova.

Na figura 20 pode-se observar a distribuição dos microrganismos e suas percentagens pelos intervalos definidos.

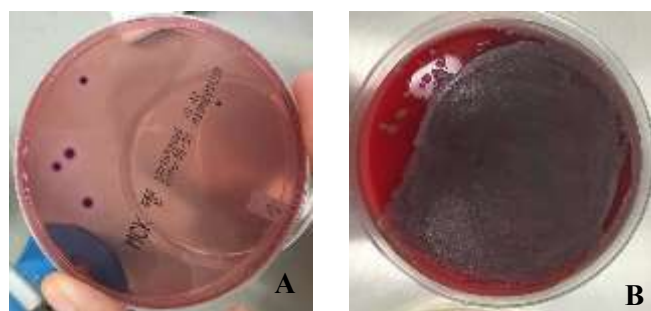


Figura 19 - Crescimento bacteriano, exemplificativo. A - Ágar de MaConkey, B- Gelose de Sangue.

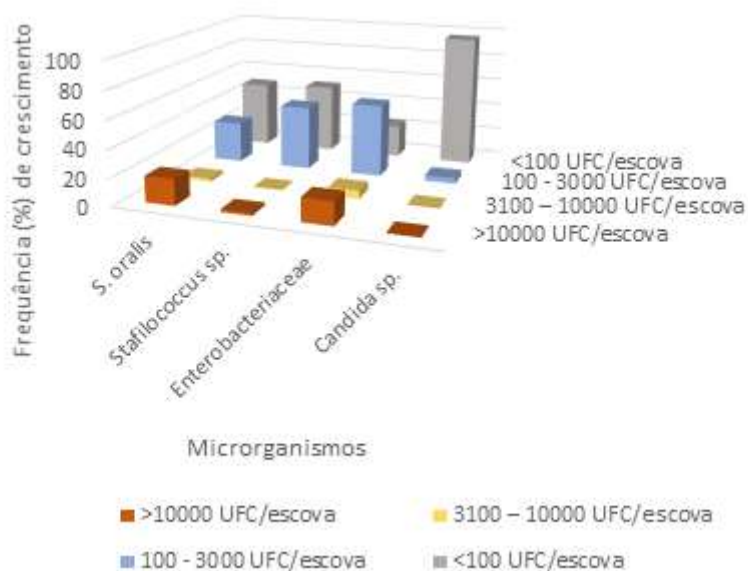


Figura 20 Crescimento microbiano (%) (ufc/escova) nas escovas (n=47) recolhidas dos alunos universitários do ISCSEM.em função dos intervalos de concentração.

4.6.- Resultado da análise das cerdas dentárias dos alunos universitários sujeitas ao protocolo de desinfeção:

Em relação às escovas recolhidas após a segunda fase realizada com os voluntariados, só 16 de 20 alunos universitários seguiram o protocolo de desinfeção e as suas escovas foram recolhidas e analisadas.

Após a implementação do protocolo de desinfeção utilizando o antisséptico Listerine[®], obteve-se concentrações abaixo de 100 ufc/escova para a maioria dos microrganismos, com a exceção de *Enterobacteriaceae*, nas quais 94% das contagens se encontram no intervalo $100 \leq X < 3000$ ufc/escova (figura 21).

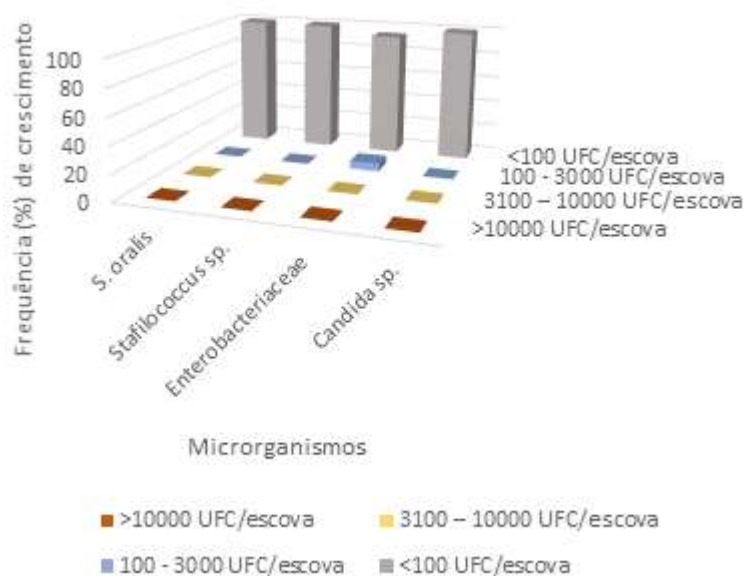


Figura 21 Crescimento microbiano, após o protocolo de desinfeção utilizando o colutório Listerine[®].

Os valores médios e as medianas das contagens de microrganismos totais em ambas as fases (sem e com desinfeção) estão apresentados na tabela 10 e figura 22. A comparação das medianas, através do teste Mann-Whitney, evidencia uma diferença com significado estatístico ($p < 0,001$).

Tabela 10 - Média e Mediana dos microrganismos da amostra sem desinfecção (n=47) e depois da desinfecção (n=16).

	Contagens totais (log ufc/escova)	
	Sem desinfecção (n=47)	Com desinfecção (n=16)
Média	3,903	1,950
Mediana	3,938	1,875

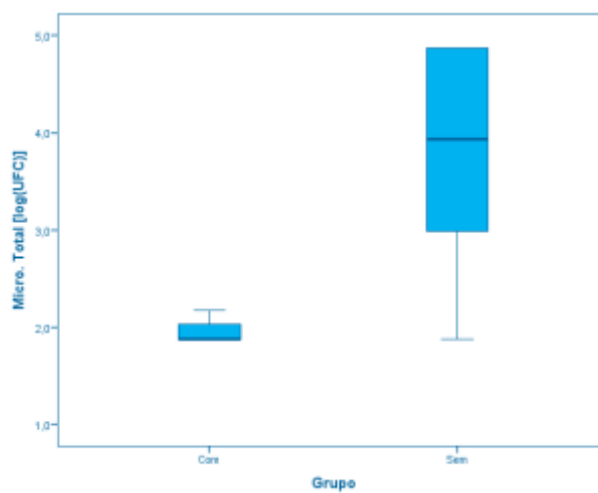


Figura 22 - Distribuição dos valores de contagens dos microrganismo totais (log ufc/escova) nas escovas com desinfecção e sem desinfecção.

5. DISCUSSÃO

Caracterização da amostra:

Os voluntários selecionados para este trabalho de investigação frequentavam o último ano do curso de Medicina Dentária. Sendo estes futuros médicos dentistas e promotores de saúde oral procurou-se avaliar os seus conhecimentos sobre métodos de desinfeção das escovas dentárias através de um questionário e também sensibilizar para a importância desta prevenção.

Ao avaliar o questionário aplicado verificou-se que apenas dois indivíduos responderam positivamente à questão sobre as doenças sistémicas, identificando a doença Basedow-Graves, por um e a doença Diabetes, por outro. Esta baixa frequência de patologia sistémica parece dever-se à média de idades relativamente jovem da amostra em estudo (24 anos), uma vez que em populações jovens a prevalência de doenças sistémicas é reduzida. A doença de Graves é uma doença autoimune que afeta a tiróide e geralmente provoca hipertiroidismo e protuberância dos olhos (Menconi, Marcocci, & Marinò, 2014), não apresentando qualquer relevância na saúde oral. No entanto a Diabetes *mellitus* pode ter implicações na cavidade oral e está fortemente relacionada com a doença periodontal uma vez que se trata de uma desordem metabólica caracterizada por uma hiperglicémica crónica com alterações a nível dos hidratos de carbono, gordura e proteína, resultante de um defeito da secreção de insulina, da sua ação ou de ambos (Negrato & Tarzia, 2010).

Caracterização da amostra quanto aos hábitos de higiene oral:

Em relação aos hábitos de higiene oral analisados nos inquiridos, 57% afirmou lavar os dentes duas vezes por dia, enquanto 38% revelou escovar os dentes 3 vezes ao dia. Estes resultados opõem-se ligeiramente do estudo realizado por Dias, (2015), com alunos de Medicina Dentária da Universidade Católica Portuguesa (UCP), em Viseu, no qual 37,9% dos seus voluntários afirmou escovar duas vezes por dia e 59,1% três vezes por dia. Contudo, apesar de diferentes, em ambos os estudos os participantes respeitam as

recomendações da Direção Geral de Saúde (DGS), que aconselha uma higienização oral após cada refeição ou pelo menos duas vezes por dia.

Caracterização da amostra quanto aos cuidados e manutenção das escovas dentárias:

No que diz respeito à frequência da substituição da escova, a maioria dos estudantes trocam de escova a cada 3 meses o que se assemelha à prática dos alunos universitários da UCP, Dias (2015) e às recomendações da ADA.

Quanto aos métodos de desinfecção das escovas dentárias, apenas uma baixa percentagem de indivíduos (15%) afirmou conhecer um método. Esta pequena percentagem é verificada tanto no nosso estudo como no estudo de Mialhe e colaboradores (2007), onde apenas 16% dos participantes desinfetavam as escovas com antisséptico, e no estudo de Queiroz e colaboradores (2013) onde 25% conhecia a temática. Ainda assim estes autores, e no presente estudo, obtiveram resultados superiores ao estudo de Nelson-Filho e colaboradores (2000), no qual nenhum aluno realizava algum processo de desinfecção das escovas (Mialhe et al., 2007).

Em relação aos hábitos de limpeza das escovas dentárias, todos os sujeitos da amostra passam a escova por água, porém 58% afirmaram lavar sem remover o excesso de água. Este valor encontra-se inferior aos hábitos dos indivíduos da amostra de Queiroz e colaboradores (2013) (85,8%) e superiores aos de Zão e colaboradores (2011) (36,6%) e Mialhe (2007) (21,3%). Só 25% dos indivíduos da amostra fazem o processo básico adequado de limpeza de modo a evitar contaminação, concretamente a lavagem com água corrente e remoção do excesso de água (sem recorrer a toalhas ou panos). Esta secagem da água da escova deve ser realizada por meio de batidas na borda do lavatório e evitando a utilização de toalhas ou panos de papel (Queiroz et al., 2013; Zão, Silva, & Alves, 2011), visto que as toalhas estão contaminadas com *Staphylococcus* entre outras bactérias provenientes da secagem das mãos (Abd-ulnabi, 2012). Idealmente, o último passo seria a utilização de antissépticos orais de modo a eliminar todos os microrganismos (Queiroz et al., 2013). Quanto ao seu armazenamento, 53% conservam a escova sem tampa num copo em cima do lavatório, valor muito superior ao registado nos estudos de Zão e

colaboradores (2011) (17,2%) e de Queiroz e colaboradores (2013) (9,1%). Relativamente à opção armazenamento da escova dentro de um armário, o nosso valor (5%) difere grandemente dos 75,3%, 53,8% e 37,5% encontrados nos estudos de Mialhe e colaboradores (2007), Zão e colaboradores (2011) e Queiroz e colaboradores (2013), respetivamente. Apesar da controvérsia em relação à conservação das escovas em armários, os valores do presente estudo demonstraram que os estudantes do ISCSEM seguem as recomendações de ADA e de Queiroz e colaboradores (2013), que aconselham a não armazenar as escovas dentárias em locais fechados pois estes proporcionam ambientes quentes e húmidos propensos a proliferação bacteriana (Queiroz et al., 2013). Outros autores como Mialhe e colaboradores (2007) e Zão e colaboradores (2011) defendem o armário como o local mais indicado de modo a prevenir a contaminação de bactérias uma vez que o lavatório é um local contaminado por si só, e sujeito a aerossóis.

Seleção do colutório a aplicar como método de desinfecção:

Vários estudos realizados anteriormente demonstraram uma redução na contagem bacteriana das escovas dentárias utilizando antissépticos orais (Frazelle & Munro, 2012; Komiyama et al., 2010). Na presente investigação foram analisadas *in vitro* a eficácia de quatro soluções antimicrobianas (clorexidina (CHX) 0,12%, cloreto de cetilpiridínio (CCP) 0,5%, triclosan e óleos essenciais (OE)), na redução da contagem das bactérias *S. aureus*, *S. mutans*, *E. faecalis*, *E. coli* e da levedura *C. albicans*, para selecionar qual utilizar no protocolo de desinfecção. Cada um dos microrganismos selecionados tem a capacidade de colonizar a cavidade oral bem como os locais comuns de armazenamento das escovas (Ferreira, Savi, Panatto, Generoso, & Barichello, 2012). Os colutórios CHX e triclosan, apesar de dispendiosos, foram selecionados devido à sua elevada eficácia descrita na literatura (Basman et al., 2016; Komiyama et al., 2010), e os colutórios CCP e OE foram escolhidos, pois para além da sua eficácia são de fácil acesso e disponibilidade no mercado (Frazelle & Munro, 2012; Sato et al., 2004).

Alguns investigadores estudaram a eficácia da CHX (Basman et al., 2016), CCP (Sato et al., 2005), triclosan (Komiyama et al., 2010) e OE (Basman et al., 2016) contra microrganismos retidos nas escovas dentárias, e todos provaram que são desinfetantes

eficazes, embora uns mais do que outros (Frazelle & Munro, 2012; Gonçalo & Mialhe, 2009).

No presente estudo os OE obtiveram os melhores resultados, com reduções de todas as espécies microbianas para valores $<5 \times 10$ ufc/escova, quando comparado com os restantes agentes químicos em estudo. Por este motivo foi o colutório eleito para integrar o protocolo de desinfeção.

No estudo realizado por Basman e colaboradores (2016), e Fardin e colaboradores (2011) concluiu-se que os OE podem ser um método de desinfeção eficaz com resultados bastante satisfatórios contra os microrganismos *S. mutans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* e *C. albicans*, embora Fardin e colaboradores (2011) não tivessem obtido uma redução tão eficaz como a do presente estudo ou de Basman e colaboradores (2016). Pelo contrário, Mehta (2007) e Belanger-Giguere e colaboradores (2011) concluíram que a submersão das escovas em CHX apresentavam melhores resultados do que com a submersão em Listerine® (OEs) (Basman et al., 2016; Frazelle & Munro, 2012).

No estudo de Nascimento e colaboradores (2010), a CCP mostrou-se mais eficaz que a CHX, contrariamente ao que se verificou no presente estudo, com resultados idênticos entre CCP e CHX tendo ambos eliminado 100% das bactérias *S. mutans*, *E. faecalis* e *E. coli*, e reduzindo *C. albicans* e *S. aureus*. Quanto a esta última espécie, este estudo comparado com o de Nascimento e colaboradores (2010) corrobora os resultados de CHX e difere nos de CCP, onde houve a eliminação total das colónias.

Semelhante ao presente estudo, Efstratiou e colaboradores 1996 também estudaram o efeito do triclosan, e concluíram que este colutório apresenta fracas reduções nas contagens microbianas. Diversos autores referem o seu uso em pastas dentífricas como benefício para a descontaminação das escovas comparativamente aos dentífricos sem triclosan (Frazelle & Munro, 2012; Gonçalo & Mialhe, 2009).

Resultados da análise das cerdas dentárias dos alunos universitários sem desinfeção:

Foi encontrado crescimento bacteriano em todas as escovas recolhidas na primeira fase da investigação, isto é, sem a aplicação de qualquer protocolo de investigação, o que revela que as escovas são ótimos veículos de transporte e crescimento bacteriano. Este facto vai ao encontro de diversos estudos descritos na literatura (Bezirtzoglou et al., 2008; Frazelle & Munro, 2012; Naik et al., 2015; Queiroz et al., 2013).

Inúmeros estudos demonstraram que a escova armazena vários microrganismos, tais como *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Candida*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Lactobacilli* e *Pseudomonas* (Bezirtzoglou et al., 2008; Ferreira et al., 2012; Naik et al., 2015; Peker et al., 2014). Os microrganismos isolados nesta fase do estudo foram *Streptococcus* orais, Enterobacteriaceae, *Staphylococcus spp.*, e *Candida spp.* Os microrganismos foram identificados recorrendo a características fenotípicas sendo as contagens feitas com base na morfologia das colónias com crescimento em meios seletivos. O meio de gelose de sangue foi utilizado para a contagem total dos microrganismos, o meio de Chapman para o crescimento de *Staphylococcus spp.*, o meio MacConkey para o crescimento seletivo de *Enterobacteriaceae*, o meio Mitis Salivarius agar para o crescimento de *Streptococcus* orais e o meio seletivo chromID™ *Candida* para levedura *Candida spp.*

A contagem microbiana nas escovas analisadas revelou concentrações variáveis e por esse motivo foram agrupadas em quatro intervalos de concentração, nomeadamente $X < 100$ ufc/escova; $100 \leq X < 3000$ ufc/escova; $3000 \leq X < 10000$ ufc/escova; $X \geq 10000$ ufc/escova. Estas oscilações de concentrações microbianas podem, segundo Rodrigues et al. (2012), estar associados a vários fatores como: o método de escovagem do indivíduo; o tipo de pasta de dentes (se apresenta propriedades antibióticas ou não) (Rodrigues et al., 2012); local de armazenamento da escova; a água utilizada para fazer a higiene oral e lavagem da escova (Samuel & Ifeanyi, 2015).

As bactérias isoladas em maior percentagem nas escovas dentárias foram *Enterobacteriaceae* (84,4%), valores que se encontram de acordo com os analisados por Ferreira e colaboradores (2012) (80%). Em ambos os estudos a maioria dos sujeitos armazenavam as escovas em cima de lavatórios, e pensa-se que a contaminação pode advir do seu acondicionamento (Ferreira-nóbilo & Rosário, 2014; Sato et al., 2004). Long

e Santos (2000) decidiram testar esta teoria e reportaram uma contaminação de 70% de *Enterobacteriaceae* nas escovas mantidas em cima do lavatório da casa de banho e 0% nas escovas armazenadas dentro de armários (Ferreira-nóbilo & Rosário, 2014; Mialhe et al., 2007). Também Contreras e colaboradores (2010) afirmam que a contaminação provém maioritariamente da contaminação do meio e não tanto da própria cavidade oral. No seu estudo, isolaram *Enterobacteriaceae* nas escovas dentárias depois de um mês de uso e compararam com as bactérias recolhidas das bolsas subgingivais. Verificaram uma maior prevalência nas escovas (62,5%) que no sulco periodontal (20,5%). Ou seja, as *Enterobacteriaceae* podem contaminar as escovas através da sua exposição aos aerossóis circulantes das descargas do autoclismo, da humidade do meio, da água utilizada para limpar a escova dentária e da falta de higiene das mãos (Busato et al., 2015; Contreras, Arce, Botero, Jaramillo, & Betancourt, 2010; Ferreira et al., 2012).

Nas escovas dentárias podem ser encontrados, para além de coliformes fecais, microrganismos dos géneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Candida* (Júnior et al., 2011), como foi verificado neste estudo. *Streptococcus* é uma bactéria dominante na microbiota oral, estando intimamente relacionada com a placa supragengival e apresenta capacidade de acidificar o biofilme oral aumentando o seu potencial patogénico (Nascimento, Trinca, Pita, & Pedrazzi, 2015). Os microrganismos *Streptococcus* orais são bactérias pioneiras na formação do biofilme dentário e têm a capacidade de colonizar todas as superfícies moles e duras da cavidade oral. Por este motivo, *Streptococcus* orais foram bactérias vulgarmente isoladas (70,2%) nas escovas em estudo. Este facto é comum a outros estudos como Bezirtzoglou e colaboradores (2008) e Nascimento e colaboradores (2015).

Encontraram-se elevadas percentagens de *Staphylococcus spp.* (63,8%) nas escovas à semelhança dos estudos de Samuel & Ifeanyi (2015) e de Rodrigues e colaboradores (2012) que isolaram a bactéria em mais de metade das escovas. Apesar de serem bactérias residentes da microbiota oral, alguns autores referem que a contaminação pode dever-se ao simples ato de passar os dedos nas cerdas das escovas depois da lavagem (Busato et al., 2015; Queiroz et al., 2013). E merece uma atenção cuidada pois é o agente mais comum em infeções piogénicas e abscessos (Semenoff, Semenoff-Segundo, & Biasoli, 2008).

De forma semelhante, também *Candida spp.* é um agente patogénico oportunista, que pode provocar complicações quando a homeostase microbiana é quebrada (Wade, 2013). No presente estudo, *Candida* foi o microrganismo que apresentou contagens mais baixas (8,6%). É a levedura mais incidente na cavidade oral, e pode ser transportada de modo assintomático nos tratos gastrointestinal e geniturinário pela maioria dos indivíduos (Kabir, Hussain, & Ahmad, 2012). Zão e colaboradores (2011) apesar de terem apresentado uma maior frequência (29%) de leveduras, referem que todos os sujeitos eram saudáveis.

Muitos autores defendem que a carga microbiana tende a aumentar exponencialmente com a frequência de uso (Ferreira et al., 2012; Karibasappa, Nagesh, & Sujatha, 2011), visto que a recomendação da OMS consiste numa elevada frequência de escovagens/dia, destaca-se a importância da desinfeção destes dispositivos de modo a assegurar o controlo da carga microbiana e também a necessidade da sua substituição frequente, almejando assim uma boa saúde oral e consequentemente boa saúde geral. (Ferreira et al., 2012).

Resultados da análise das cerdas dentárias dos alunos universitários com desinfeção:

No presente estudo teve-se em conta os melhores resultados obtidos *in vitro* utilizando-se o colutório oral Listerine® como método de desinfeção das escovas dentárias. Este colutório é a solução mais popular de combinações de óleos essenciais, que representa o agente antimicrobiano mais antigo no uso clínico da Medicina Dentária (Quintas, Prada-López, Prados-Frutos, & Tomás, 2014).

Com os resultados obtidos, chegou-se às mesmas conclusões que Caudry e colaboradores (1995) e Basman e colaboradores (2016), ou seja, que existe uma diminuição significativa das contagens de microrganismos com a submersão das escovas em Listerine®. No presente estudo testou-se um tempo de contacto mais reduzido, 5 minutos, de modo a ser mais fácil e executável no quotidiano, em comparação com os 20 minutos de ambos os outros estudos. Mesmo com o tempo mais curto conseguiu-se, da mesma forma, uma diminuição nas contagens das colónias isoladas nas escovas.

Verificou-se que esta diminuição é estatisticamente significativa ($p < 0,001$), aceitando assim a hipótese alternativa de que o protocolo de desinfecção aplicado é eficiente. Conclui-se que esta solução antimicrobiana Listerine® é um método eficaz na desinfecção das escovas dentárias.

Embora até à data não exista evidência na literatura, não excluimos que a aplicação deste agente desinfetante possa ter efeitos secundários indesejáveis nas cerdas das escovas. Esta temática poderá ser abordada em futuros estudos.

6. CONCLUSÕES

Tendo em consideração a análise dos resultados obtidos, é possível concluir que:

- Colutórios contendo clorexidina 0,12%, triclosan, cloreto cetilpiridínio 0,05%, óleos essenciais (eucaliptol, timol, mentol salicilato de metila) reduziram satisfatoriamente as contagens das bactérias *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli* e da levedura *Candida albicans*.
- As escovas são contaminadas por microrganismos com potencial patogénico: *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* orais, *Staphylococcus* e *Candida*, favorecendo o seu crescimento microbiano.
- O protocolo de desinfecção estudado e proposto é simples, aplicável e eficaz. Pode ser implementado na rotina diária de higiene oral para uma opção de prevenção no âmbito da saúde oral e geral.

Os resultados reforçam a necessidade da divulgação de informação sobre os cuidados e manutenção das escovas dentárias não só a nível social, mas também a nível pedagógico, ao gerar a consciência dos académicos desta problemática e incentivar o seu papel de educador na sociedade.

Linhas para Futuras Investigações:

Assim, atendendo aos aspetos abordados neste estudo, à literatura atual e dada a importância do controlo da contaminação microbiana e a sua relação com a saúde em geral, seria interessante:

- Adicionar à análise laboratorial a eficácia sobre outro tipo de microrganismos como os vírus, uma vez que a flora é complexa e diversificada (Wade, 2013).
- Agregar à metodologia os efeitos do protocolo de desinfecção diária com Listerine® sobre as propriedades de superfície e conservação das cerdas dentárias, uma vez que a sua influência ainda não foi estudada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aas, J. a, Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., & Dewhirst, F. E. (2005). Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), 5721–5732. <http://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5721>
- Abd-ulnabi, R. (2012). Bacterial contamination of toothbrushes with comparison of healthy and dental patients. *Basrah Journal of Scienc*, 30(1), 120–130.
- Ankola, A., Hebbal, M., & Eshwar, S. (2009). How clean is the toothbrush that cleans your tooth? *International Journal of Dental Hygiene*, 7(4), 237–240. <http://doi.org/10.1111/j.1601-5037.2009.00384.x>
- Balagopal, S., & Arjunkumar, R. (2013). Chlorhexidine: The gold standard antiplaque agent. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(12), 270–274.
- Barros, O., Pernambuco, R., & Tomita, N. (2001). Escovas Dentais. *Revista Faculdade Odontologica São José Dos Campos*, 4(1), 32–37.
- Barroso, H., Taveira, N., & Meliço-Silvestre, A. (2014). *Microbiologia Médica*. (Lidel, Ed.) (volume 1).
- Basman, A., Peker, I., Akca, G., Alkurt, M. T., Sarikir, C., & Celik, I. (2016). Evaluation of toothbrush disinfection via different methods. *Brazilian Oral Research*, 30(6), 11–16. <http://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0006>
- Bezirtzoglou, E., Cretoiu, S. M., Moldoveanu, M., Alexopoulos, A., Lazar, V., & Nakou, M. (2008). A quantitative approach to the effectiveness of ozone against microbiota organisms colonizing toothbrushes. *Journal of Dentistry*, 36(8), 600–605. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2008.04.007>
- Bhat, S. S., Hegde, K. S., & George, R. M. (2003). Microbial contamination of tooth brushes and their decontamination. *Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 21(3), 108–112.
- Busato, C., Cavazzola, A., Ortega, A., Guaré, R., & Neto, A. (2015). Utilização do hipoclorito de sódio na descontaminação de escovas dentais : estudo in vitro. *Revista Odontologica UNESP*, 44(6), 335–339.
- Camargo, R., Schimim, S., Alves, F., & Chibinski, A. (2013). Avaliação microbiológica da efetividade de uma escova antibacteriana: um estudo in vivo. *Revista Odontologica UNESP*, 42(1), 54–58.

- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 822–880. <http://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>
- Dann, A. B., & Hontela, A. (2011). Triclosan: Environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *Journal of Applied Toxicology*, 31(4), 285–311. <http://doi.org/10.1002/jat.1660>
- Dewhirst, F. E., Chen, T., Izard, J., Paster, B. J., Tanner, A. C. R., Yu, W. H., ... Wade, W. G. (2010). The human oral microbiome. *Journal of Bacteriology*, 192(19), 5002–5017. <http://doi.org/10.1128/JB.00542-10>
- DGS. (2008). *Estudo Nacional de Prevalência das Doenças Orais*. Lisboa.
- Dias, A. (2015). *Atitudes e comportamentos de saúde oral em estudantes de Medicina Dentária em Portugal e na Holanda - Um estudo comparativo*.
- Efstratiou, M., Papaioannou, W., Nakou, M., Ktenas, E., Vrotsos, I. A., & Panis, V. (2007). Contamination of a toothbrush with antibacterial properties by oral microorganisms. *Journal of Dentistry*, 35(4), 331–337. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2006.10.007>
- Fardin, R. F., Barcelos, K., Xavier, C., Paula, A., & Nunes, F. (2011). Concentração inibitória mínima de antissépticos bucais em microrganismos da cavidade oral. *Revista Brasileira de Pesquisa Em Saúde*, 13(3), 10–16.
- Feres, M., Figueiredo, L. C., Faveri, M., Stewart, B., & Vizio, W. De. (2011). cloreto de cetilpiridínio na redução de bactérias no consultório dentário. *Prática Clínica*, 11(5), 40–46.
- Ferreira, C. A., Savi, G. D., Panatto, A. P., Generoso, S., & Barichello, T. (2012). Microbiological evaluation of bristles of frequently used toothbrushes Avaliação microbiológica das cerdas de escovas dentárias de uso frequente. *MSc in Health Sciences, Universidade Do Extremo Sul Catarinense*, 17(4), 2–7.
- Ferreira-nóbilo, N. D. P., & Rosário, L. (2014). Conceptualization of Dental Caries by Undergraduate Dental Students from the First to the Last Year. *Brazilian Dental Journal*, 25(1), 59–62.
- Frazelle, M. R., & Munro, C. L. (2012). Toothbrush Contamination: A Review of the Literature. *Nursing Research and Practice*, 2012, 1–6. <http://doi.org/10.1155/2012/420630>
- Gebran, M., & Gebert, A. (2002). Controle químico e mecânico de placa bacteriana.

Tuiuti: Ciência E Cultura, 26(3), 45–57.

- Gendron, R., Grenier, D., & Maheu-Robert, L. F. (2000). The oral cavity as a reservoir of bacterial pathogens for focal infections. *Microbes and Infection*, 2(8), 897–906. [http://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00391-9](http://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00391-9)
- Gonçalo, C. D. S., & Mialhe, F. L. (2009). Contaminação das escovas dentais: Uma revisão. *Revista Periodontia*, 19(número 03), 56–63.
- Grover, D., Kaur, G., Kaushal, S., & Malhotra, R. (2012). Toothbrush 'A key to mechanical plaque control'. *Indian Journal of Oral Sciences*, 3(2), 62–68. <http://doi.org/10.4103/0976-6944.106456>
- Gurenlian, J. R. (2007). The Role of dental plaque biofilm in oral health. *Journal of Dental Hygiene*, 81(5), 1–11.
- Haas, A., Pannuti, C., Andrade, A., Escobar, E., Almeida, E., Costa, F., ... Oppermann, R. (2014). Mouthwashes for the control of supragingival biofilm and gingivitis in orthodontic patients: evidence-based recommendations for clinicians. *Brazilian Oral Research*, 28(Edicao especial 1), 1–8. <http://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2014.vol28.0021>
- Heath, R. J., Rinald, R. J., Holland, D. R., Zhang, E., Snow, M. R., & Rock, C. O. (1999). et al. Mechanism of triclosan inhibition of bacterial fatty acid synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(16), 11110–11114. <http://doi.org/10.1074/jbc.274.16.11110>
- Hill, M. J., & Marsh, P. D. (1989). *Human Microbial Ecology*. Florida: CRC Press.
- Huang, R., Li, M., & Gregory, R. L. (2011). Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence*, 2(5), 435–444. <http://doi.org/10.4161/viru.2.5.16140>
- JADA. (2007). A look at toothbrushes. *The Journal of the Amedical Dental Association*, 138(September), 1288.
- Jafer, M., Patil, S., Hosmani, J., Bhandi, S. H., Chalisserry, E. P., & Anil, S. (2016). Chemical Plaque Control Strategies in the Prevention of Biofilm-associated Oral Diseases. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 17(4), 337–343. <http://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-1851>
- Jakubovics, N. S., & Kolenbrander, P. E. (2010). The road to ruin: The formation of disease-associated oral biofilms. *Oral Diseases*, 16(8), 729–739. <http://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2010.01701.x>
- Janković, S. M., Milošev, M. Z., & Novaković, M. L. J. (2014). The Effects of Microwave Radiation on Microbial Cultures. *Hospital Pharmacology*, 1(2), 102–108.

- Jenkinson, H. F., & Lamont, R. J. (2005). Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends in Microbiology*, 13(12), 589–595. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2005.09.006>
- Jorge, A. o. (1998). *Microbiologia e Imunologia Oral*.
- Júnior, H., Reis, J., Júnior, E., Andrade, P., Diniz, C., & Salgado, I. (2011). Os microorganismos contaminam as escovas dentais ? *HU Revista*, 37(4), 409–412.
- Júnior, J. C., & Pallos, D. (2001). Avaliação da esterilização de escovas dentais em forno de microondas (estudo in vitro). *Revista Biociência*, 7(2), 39–42.
- Kabir, M. A., Hussain, M. A., & Ahmad, Z. (2012). Candida albicans: A Model Organism for Studying Fungal Pathogens. *International Scholarly Research Network Microbiology*, 2012, 1–15. <http://doi.org/10.5402/2012/538694>
- Kats, A., Båge, T., Georgsson, P., Jönsson, J., Quezada, H., Gustafsson, A., ... Yucel-Lindberg, T. (2013). Inhibition of microsomal prostaglandin e synthase-1 by aminothiazoles decreases prostaglandin E2 synthesis in vitro and ameliorates experimental periodontitis in vivo. *FASEB Journal*, 27(6), 2328–2341. <http://doi.org/10.1096/fj.12-214445>
- Kim, J., & Sudbery, P. (2011). Candida albicans, a Major Human Fungal Pathogen. *The Journal of Microbiology*, 49(2), 171–177. <http://doi.org/10.1007/s12275-011-1064-7>
- Komiyama, E. Y., Back-Brito, G. N., Balducci, I., & Koga-Ito, C. Y. (2010). Evaluation of alternative methods for the disinfection of toothbrushes. *Brazilian Oral Research*, 24(1), 28–33. <http://doi.org/10.1111/j.1601-5037.2011.00503.x>
- Lamont, R. J., & Jenkinson, H. F. (2010). *Oral Microbiology at a Glance* (1st ed.). Wiley-Blackwell.
- Lamont, R. J., Jenkinson, H. F., & Hajishengallis, G. N. (2014). *Oral Microbiology and Immunology* (2nd ed.).
- Lindhe, J., & Lang, N. P. (2003). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. WILEY Blackwell (4th ed., Vol. 53). Blackwell. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Lopez-Romero, J. C., González-Ríos, H., Borges, A., & Simões, M. (2015). Antibacterial Effects and Mode of Action of Selected Essential Oils Components against Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1–9. <http://doi.org/10.1155/2015/795435>
- Marsh, P. D. (2004). Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Research*, 38(3), 204–

211. <http://doi.org/10.1159/000077756>
- Marsh, P. D. (2006). Dental plaque as a biofilm and a microbial community - Implications for health and disease. *BMC Oral Health*, 6(14). <http://doi.org/10.1016/j.job.2015.08.002>
- Marsh, P. D. (2010). Controlling the oral biofilm with antimicrobials. *Journal of Dentistry*, 38(SUPPL. 1), S11–S15. [http://doi.org/10.1016/S0300-5712\(10\)70005-1](http://doi.org/10.1016/S0300-5712(10)70005-1)
- Marsh, P. D., & Devine, D. A. (2011). How is the development of dental biofilms influenced by the host? *Journal of Clinical Periodontology*, 38(11), 28–35. <http://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01673.x>
- Marsh, P. D., & Matin, M. V. (2010). *Oral Microbiology* (5th ed.).
- Mathur, S., Mathur, T., Srivastava, R., & Khatri, R. (2011). Chlorhexidine: The gold standard in chemical plaque control. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, 1(2), 45–50.
- Menconi, F., Marcocci, C., & Marinò, M. (2014). Diagnosis and classification of Graves' disease. *Autoimmunity Reviews*, 1–5. <http://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.01.013>
- Mialhe, F. L., Silva, D. D., & Possobon, R. de F. (2007). Avaliação dos cuidados relativos ao armazenamento e desinfecção das escovas dentais por acadêmicos de Odontologia. *Revista de Odontologia Da UNESP*, 36(3), 231–235.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Michael, A. (2015). *Medical Microbiology* (8th ed.). Elsevier.
- Naik, R., Mujib, A. B. R., Telagi, N., Anil, B. S., & Spoorthi, B. R. (2015). Contaminated tooth brushes—potential threat to oral and general health. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 4(3), 444–448. <http://doi.org/10.4103/2249-4863.161350>
- Nascimento, C. Do, Sorgini, M. B., Pita, M. S., Fernandes, F. H. C. N., Calefi, P. L., Watanabe, E., & Pedrazzi, V. (2014). Effectiveness of three antimicrobial mouthrinses on the disinfection of toothbrushes stored in closed containers: A randomized clinical investigation by DNA Checkerboard and Culture. *Gerodontology*, 31(3), 227–236. <http://doi.org/10.1111/ger.12035>
- Negrato, C. A., & Tarzia, O. (2010). Buccal alterations in diabetes mellitus. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 2(3), 1–11.
- Nelson-Filho, P., Macari, S., Faria, G., Assed, S., Izabel, S., & Ito, Y. (2000). Microbial contamination of toothbrushes and their decontamination. *American Academy of Pediatric Dentistry*, 22(5), 381–384.
- Pedrazzi, V., Souza, S., Oliveira, R., Cimões, R., & Gusmão, E. (2009). Métodos

- mecânicos para o controle do biofilme dentário supragengival. *Revista Periodontia*, 19(3), 26–33.
- Peker, I., Akca, G., Sarikir, C., Toraman Alkurt, M., & Celik, I. (2014). Effectiveness of alternative methods for toothbrush disinfection: An in vitro study. *Scientific World Journal*, 2014, 1–10. <http://doi.org/10.1155/2014/726190>
- Penick, C. (2004). Power toothbrushes: a critical review. *International Journal of Dental Hygiene*, 2(1), 40–44. <http://doi.org/10.1111/j.1601-5037.2004.00048.x>
- Queiroz, F., Nóbrega, C., Costa, L., Reul, M., Abreu, R., & Leite, M. (2013). Avaliação do perfil de armazenamento e descontaminação das escovas dentais. *Revista Odontologica UNESP*, 42(2), 89–93.
- Quintas, V., Prada-López, I., Prados-Frutos, J. C., & Tomás, I. (2014). In situ antimicrobial activity on oral biofilm: essential oils vs. 0.2 % chlorhexidine. *Clinical Oral Investigations*, 19, 97–107. <http://doi.org/10.1007/s00784-014-1224-3>
- Rodrigues, L. K., Motter, C. W., Pegoraro, D. A., Menoli, A. P. V., & Menolli, R. A. (2012). Microbiological contamination of toothbrushes and identification of a decontamination protocol using chlorhexidine spray. *Unipar Brasil*, 27(3), 213–217.
- Russell, A. D. (2004). Whither triclosan? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(5), 693–695. <http://doi.org/10.1093/jac/dkh171>
- Saini, R., & Saini, S. (2010). Microbial flora on toothbrush - At greater risk. *Annals of Nigerian Medicine*, 4(1), 31. <http://doi.org/10.4103/0331-3131.73882>
- Samuel, O., & Ifeanyi, O. (2015). Bacterial Contamination of Used Manual Toothbrushes Obtained from Some Students of Nnamdi Azikiwe. *Universal Journal of Microbiology Research*, 3(4), 56–59. <http://doi.org/10.13189/ujmr.2015.030404>
- Santos, D. O., Leal, B., Ferreira, A., Rodrigues, C. R., & Castro, H. C. (2007). Staphylococcus aureus : visitando uma cepa de importância hospitalar, 413–423.
- Sato, S., Ito, I. Y., Lara, E. H. G., Panzeri, H., Albuquerque Junior, R. F. De, & Pedrazzi, V. (2004). Bacterial survival rate on toothbrushes and their decontamination with antimicrobial solutions. *Journal of Applied Oral Science : Revista FOB*, 12(2), 99–103. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21365129>
- Sato, S., Pedrazzi, V., Guimarães Lara, E. H., Panzeri, H., Ferreira de Albuquerque, R., & Ito, I. Y. (2005). Antimicrobial spray for toothbrush disinfection: an in vivo evaluation. *Quintessence International*, 36(10), 812–816.
- Schaechter, M. (2009). *The Desk Encyclopedia of Microbiology* (2nd ed.). Elsevier.
- Schweizer, H. P. (2001). Triclosan: A widely used biocide and its link to antibiotics.

- FEMS Microbiology Letters*, 202(1), 1–7. [http://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00273-7](http://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00273-7)
- Semenoff, T. A. D. V., Semenoff-Segundo, A., & Biasoli, É. R. (2008). Efetividade antimicrobiana in vitro de enxaguatórios bucais frente aos microorganismos *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Odonto Ciência*, 23(4), 351–354.
- Seneviratne, C. J., Zhang, C. F., & Samaranyake, L. P. (2011). Dental Plaque Biofilm in oral Health and Disease. *The Chinese Journal of Dental Research*, 14(2), 87–94.
- Serrano, J., Escribano, M., Roldán, S., Martín, C., & Herrera, D. (2015). Efficacy of adjunctive anti-plaque chemical agents in managing gingivitis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 42(16), 106–138. <http://doi.org/10.1111/jcpe.12331>
- Spolidorio, D. M. P., Tardivo, T. A., dos Reis Derceli, J., Neppelenbroek, K. H., Duque, C., Spolidorio, L. C., & Pires, J. R. (2011). Evaluation of two alternative methods for disinfection of toothbrushes and tongue scrapers. *International Journal of Dental Hygiene*, 9(4), 279–283. <http://doi.org/10.1111/j.1601-5037.2011.00503.x>
- Sreenivasan, P. K., Haraszthy, V. I., & Zambon, J. J. (2013). Antimicrobial efficacy of 0.05% cetylpyridinium chloride mouthrinses. *Letters in Applied Microbiology*, 56(1), 14–20. <http://doi.org/10.1111/lam.12008>
- Teles, R. P., & Teles, F. R. F. (2009). Antimicrobial agents used in the control of periodontal biofilms: effective adjuncts to mechanical plaque control? *Brazilian Oral Research*, 23(Edicao especial 1), 39–48. <http://doi.org/10.1590/S1806-83242009000500007>
- Van Tyne, D., Martin, M. J., & Gilmore, M. S. (2013). Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. *Toxins*, 5(5), 895–911. <http://doi.org/10.3390/toxins5050895>
- Varoni, E., Tarce, M., Lodi, G., & Carrassi, A. (2012). Chlorhexidine (CHX) in dentistry: state of the art. *Minerva Stomatologica*, 61(9), 399–419.
- Versteeg, P., Rosema, N., Hoenderdos, N., Slot, D., & Van der Weijden, G. (2010). The plaque inhibitory effect of a CPC mouthrinse in a 3-day plaque accumulation model - a cross-over study. *International Journal of Dental Hygiene*, 8(4), 269–275. <http://doi.org/10.1111/j.1601-5037.2009.00421.x>
- Wade, W. G. (2013). The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological Research*, 69(1), 137–143. <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.11.006>

- Wang, Q., Zhang, C., Chu, C., & Zhu, X. (2012). Prevalence of *Enterococcus faecalis* in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis. *International Journal of Oral Science*, 4(1), 19–23. <http://doi.org/10.1038/ijos.2012.17>
- Zão, E. J. R., Silva, M. A. M., & Alves, M. U. (2011). Desinfecção e armazenamento de escovas dentais: Avaliação da prática realizada por acadêmicos do curso de odontologia da Universidade Severino Sombra - Vassouras. *Revista Pró-Universus*, 2(1), 53–64.
- Zarei, A. R., Bagheri Sadeghi, H., & Abedin, S. (2013). Selective cloud point extraction for the spectrophotometric determination of cetylpyridinium chloride in pharmaceutical formulations. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 12(4), 671–677.

8. ANEXOS

Anexo I.- Consentimento informado



Monte de Caparica, 01 de Março de 2016

Exmo.(a) Sr.(a),

No âmbito do mestrado de Medicina Dentária, sob a orientação da Professora Doutora Maria Helena de Sousa Barroso e Mestre Joana Patrícia Serrano Carvalho, solicita-se autorização para a participação na Investigação "Contaminação Microbiana das Cerdas Dentárias e a sua Desinfecção" aos alunos do 4º e 5º ano de Medicina Dentária com o objetivo de avaliar microbiologicamente o grau de contaminação das escovas dentárias, investigar a possibilidade de diminuir a contagem microbiana nas escovas com um método de desinfecção e ainda avaliar o grau de conhecimento sobre este tema.

A participação neste estudo é voluntária. A sua não participação não lhe trará qualquer prejuízo.

Este estudo pode trazer benefícios tais como aquisição de novos conhecimentos referentes à saúde oral, tal como, métodos de desinfecção, hábitos e cuidados a ter com a manutenção das escovas dentárias, que poderão vir a beneficiá-lo a si ou a terceiros no futuro ao progresso do conhecimento.

A informação recolhida destina-se unicamente a tratamento estatístico e/ou publicação e será tratada pelo(s) orientador(es) e/ou pelos seus mandatados. A sua recolha é anónima e confidencial.

(Riscar o que não interessa)

ACEITO/NÃO ACEITO participar neste estudo, confirmando que fui esclarecido sobre as condições do mesmo e que não tenho dúvidas.

(Assinatura do participante ou, no caso de menores, do pai/mãe ou tutor legal)

Anexo II – Questionários sobre contaminação microbiana das escovas dentárias e a sua



QUESTIONÁRIO

PESQUISA: Contaminação Microbiana de Escovas Dentárias e a Sua Desinfecção.

1. Idade: _____
2. Género: F M
3. Tem alguma doença sistémica?
Sim Não
Qual? _____
4. Está ou esteve a tomar algum antibiótico na última semana?
Sim Não
5. Está ou esteve a tomar algum antifúngico no último ano?
Sim Não
6. Quantas vezes escova os dentes por dia?
1 vez 2 vezes 3 vezes >3 vezes
7. Qual é a técnica de escovagem que utiliza?

8. De quanto em quanto tempo troca a sua escova dentária?
<1 mês 2-3 meses 6 meses 1 ano >1 ano
9. Conhece algum método de desinfecção das escovas dentárias?
Sim Não
Qual? _____

10. Após a escovagem:

- a. Não lava as cerdas dentárias ou cabeça da escova.
- b. Lava a cabeça da escova com água corrente.
- c. Bate na pia para remover o excesso de água.
- d. Enxuga a escova numa toalha de pano.
- e. Enxuga a escova numa toalha de papel.
- f. Outros _____

11. Onde costuma deixar a escova dentária após a utilização?

- a. Deitada em cima da pia.
- b. Num copo em cima da pia, sem tampa.
- c. Num copo em cima da pia, com tampa.
- d. Dentro de um armário.
- e. Outro _____

